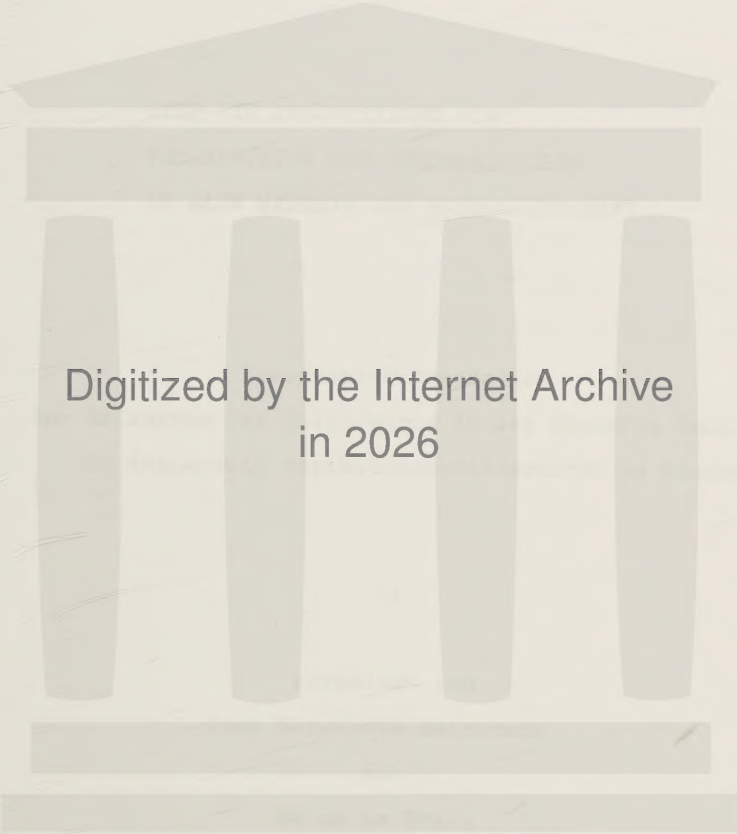


ÜBER DIE AUSSCHEIDUNG
VON PREGNANTRIOL
UND PREGNANTRIOLON
IM HARN WÄHREND DER
SCHWANGERSCHAFT

Anna Margarete Heinemann

*Less
München
1984*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. H.-B. Hadorn

ÜBER DIE AUSSCHIEDUNG VON
PREGNANTRIOL UND PREGNANTRIOLON
IM HARN WÄHREND DER SCHWANGERSCHAFT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anna Margarete Heinemann
aus
Neuss am Rhein

München 1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. D. Knorr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.-B. Hadorn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.1984

M e i n e n l i e b e n E l t e r n

in Dankbarkeit gewidmet !

Inhaltsverzeichnis

§ 1	Einleitung	1
§ 2	Fragestellung	2
§ 3	Physiologie	3
§ 4	Bisherige Daten über Pregnantriol und Pregnantriolon in der Schwangerschaft	8
§ 5	Untersuchungsgut	11
§ 6	Methode	13
§ 7	Zuverlässigkeitskriterien	21
§ 8	Abbildung einiger typischer Chromatogramme	27
§ 9	Angewandte statistische Methoden	36
§ 10	Die Pregnantriolausscheidung im Verlauf der Schwangerschaft	39
§ 11	Die Pregnantriolonausscheidung im Verlauf der Schwangerschaft	50
§ 12	Nebenergebnisse bei Auswertung der Chromatogramme	60
§ 13	Klinische Anwendung der ermittelten Normalwerte für Pregnantriol und Pregnantriolon bei Schwangeren mit behandeltem adrenogenitalen Syndrom	64
§ 14	Diskussion	72
§ 15	Zusammenfassung	77

§ 1 Einleitung

Das durch den 21-Hydroxylase-Mangel hervorgerufene adrenogenitale Syndrom (=AGS), geläufig auch unter der Bezeichnung congenitale adrenale Hyperplasie (=CAH), stellt das zweithäufigste autosomal rezessive Erb-leiden dar. Unbehandelt geht es meist mit Infertilität einher.

Durch die heute eingesetzte Hydrocortison- oder Prednison-Dauertherapie werden jedoch zunehmend mehr Patientinnen mit homozygotem AGS fertil und können Kinder gebären.

Die Kontrolle der Steroidsubstitutionstherapie wurde bisher durch die Bestimmung von 17-Ketosteroiden und 17-Hydroxy-Corticosteroiden im Harn vorgenommen. Heute mißt man stattdessen Pregnantriol und Pregnantriolon im Harn.

Daneben werden auch Plasmaparameter wie 17-Hydroxy-Progesteron, DHA-Sulfat, Androstendion und Testosteron eingesetzt.

§ 2 Fragestellung

An der Universitätskinderklinik in München erfolgt die Therapiekontrolle der Kinder und der Erwachsenen mit AGS vorwiegend anhand der Ausscheidung der typischen Steroidmetaboliten Pregnantriol (=5 β -pregnan-3 α ,17 α ,20 α -triol) und Pregnantriolon (=3 α ,17 α ,20 α -trihydroxy-5 β -pregnan-11-on). Diese Harnsteroiden werden mit einer semiautomatischen kapillar-gaschromatographischen Methode bestimmt.

Patientinnen mit gut eingestelltem AGS erreichen heute in vielen Fällen Fertilität. Da systematische Normalwerte über die Ausscheidung von Pregnantriol und Pregnantriolon im Harn im Verlauf der Schwangerschaft mit den modernen spezifischen Methoden nahezu fehlen, wurde die Aufgabe gestellt, Normalwerte dieser Harnsteroiden im Längsschnitt im Verlauf von 20 unkomplizierten Schwangerschaften zu ermitteln und damit Vergleichswerte für Schwangere mit AGS zu besitzen.

§ 3 Physiologie

Während der menschlichen Schwangerschaft unterliegt der mütterliche Organismus einer ganz entscheidenden hormonalen Umstellung.

Die fetoplacentare Funktionseinheit sezerniert in großen Mengen die schwangerschaftsspezifischen Hormone; als wichtigste seien die Proteohormone, z.B. HCG (human chorionic gonadotropin), die Steroidhormone, z.B. Östrogene und Progesteron sowie die Prostaglandine genannt.

Einen Überblick über die Endokrinologie der Schwangerschaft geben Keller (1978) und Knapstein und Hoffmann (1980); Diczfalussy (1964) und Grumbach et alii (1965) weisen auf die Bedeutung der fetoplacentaren Einheit besonders hin.

Die von der fetoplacentaren Einheit sezernierten Steroidhormone gelangen gleichermaßen in das fetale und in das mütterliche Blut.

Durch Messung von Steroid-Metaboliten im Harn können Rückschlüsse auf die im Plasma zirkulierenden Vorstufen gezogen werden.

In unserem Zusammenhang interessieren die Normalwerte der im Schwangerenurin ausgeschiedenen Mengen von Pregnantriol (=5 β -pregnan-3 α ,17 α ,20 α -triol) und Pregnantriolon (=3 α ,17 α ,20 α -trihydroxy-5 β -pregnan-11on), die Abbauprodukte des 17-Hydroxy-Progesterons (=17 α -hydroxy-4-pregnen-3,20-dion) dar-

stellen.

17-Hydroxy-Progesteron in der Schwangerschaft

In der frühen Schwangerschaft stammen Progesteron und 17-Hydroxy-Progesteron (=17-OH-P) aus dem Gelbkörper und zeigen parallel zu dessen Inaktivierung sinkende Plasmaspiegel ab 5.-8. Gestationswoche. Um die 10. Schwangerschaftswoche übernimmt die Placenta die Progesteronsynthese völlig; ab diesem Zeitpunkt zeigen die Progesteronplasmaspiegel steigende Tendenz bis zum Ende der Schwangerschaft. 17-OH-P kann jedoch zunächst nur in gleichbleibend minimalem Maße produziert werden, da es der Placenta im Gegensatz zum Gelbkörper an enzymatischer 17-Hydroxylase-Aktivität mangelt.

Im letzten Schwangerschaftstrimenon steigt der mütterliche 17-OH-P-Plasmaspiegel an, da die fetalen Nebennierenrinden eine Menge Vorstufen zur 17-OH-P-Synthese liefern.

Grundlegende Arbeiten über das Progesteron in der Schwangerschaft stammen von Zander (1955) und Zander und Münstermann (1956); als die wichtigsten Schriften über das 17-OH-P während der Gravidität seien diejenigen aufgeführt von Tulchinsky und Simmer (1972), Coats et alii (1977), Florensa et alii (1977), Harrison et alii (1978), Buster et alii (1979) und Soules et alii (1981).

Pregnantriol und Pregnantriolon in der Schwangerschaft

Pregnantriol stellt die wichtigste Abbaustufe des 17-OH-Progesterons dar. Hierbei wird 17-OH-P über 17-Hydroxy-Pregnanolon in Pregnantriol umgewandelt.

Zu einem geringen Teil kann Pregnantriol auch über 17-Hydroxy-Pregnenolon aus der Progesteronvorstufe Pregnenolon entstehen.

Dazu sei auf folgende Publikationen verwiesen: Bongiovanni (1953), Bongiovanni und Clayton (1954), Fotherby und Love (1960), Bongiovanni und Eberlein (1961) und Fotherby (1962).

Einige Autoren beschreiben, daß die physiologische Pregnantriolausscheidung im Schwangerenurin zwischen 6. und 11. Gestationswoche abfallende Tendenz zeigt (Ronan et alii, 1960), sich in der Mitte der Gravidität nicht wesentlich ändert und ab ca. 30. Woche signifikant zu steigen beginnt (Ronan et alii, 1960; Fotherby et alii, 1965; Harkness und Love, 1966). Die bisher ermittelten genauen Meßergebnisse bezüglich der Pregnantriolausscheidung während der Schwangerschaft werden unter §4 aufgeführt.

Pregnantriolon entsteht über 21-Desoxycortisol ebenfalls aus 17-OH-Progesteron.

Im Harn von gesunden Menschen kann Pregnantriolon meist nicht nachgewiesen werden (Zurbrügg, 1975); Eine physiologische Ausscheidung von Pregnan-

triolon während der Schwangerschaft wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Pregnantriol und Pregnantriolon als klinisch-diagnostische Parameter

Bei dem autosomal rezessiv vererbten adrenogenitalen Syndrom liegt eine durch Enzymdefekte bedingte Störung der Cortisolbiosynthese vor. Diese führt über den hypothalamisch-hypophysären Rückkopplungsmechanismus zu vermehrter ACTH-Sekretion.

Vor allem bei dem 21-Hydroxylase- und in geringerem Ausmaß bei dem 11 β -Hydroxylase-Defekt resultiert eine Anhäufung des "vor" dem Enzymblock befindlichen 17-OH-Progesterons im Blut.

Die 17-OH-F-Metabolite 17-Hydroxy-Pregnanolon, Pregnantriolon und an erster Stelle das Pregnantriol als Hauptabbaustufe werden besonders beim 21-Hydroxylase-Defekt im Urin vermehrt ausgeschieden. Durch ihre heute meist gaschromatographisch erfolgende Bestimmung im Harn besitzen sie als sehr spezifische und empfindliche Parameter außerordentliche Bedeutung für die Diagnose und Therapie des AGS (Holsboer und Knorr, 1976; Knorr, 1982).

Das AGS bzw. die CAH wird von Zurbrügg (1975) und Frader und Zachmann (1978) mit Literaturhinweisen ausführlich besprochen.

Das adrenogenitale Syndrom geht unbehandelt mit einer Überproduktion von androgenen Nebennierenrindensteroiden und Infertilität einher.

Durch konstante Substitution in Form von Hydrocortison oder Prednison kann in letzter Zeit immer häufiger erreicht werden, daß Patientinnen mit homozygotem AGS fertil werden.

Für ihre therapeutische Überwachung sind zum Vergleich die Normalwerte von im Schwangerenurin ausgeschiedenen Pregnantriolmengen von besonderem Interesse.

§ 4 Bisherige Daten über Pregnantriol und Pregnantriolon in der Schwangerschaft

In der Literatur finden sich nur wenige Mitteilungen über Pregnantriol in der Schwangerschaft. Die wenigen diesbezüglich angegebenen Werte beruhen vorwiegend auf unspezifischen Meßmethoden. Eine physiologische Ausscheidung von Pregnantriolon während der Schwangerschaft wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Im Folgenden werden früher angewandte Meßmethoden für Pregnantriol im Harn grob skizziert:

- a) - enzymatische Hydrolyse oder Solvolyse der Steroidkonjugate
 - Trennung der Steroidfraktionen durch Aluminiumsäulen-Chromatographie
 - quantitative Bestimmung nach Farbreaktion durch Bildung von Schwefelsäurechromogenen (Bongiovanni und Clayton, 1954; Bongiovanni und Eberlein, 1958; Fotherby und Love, 1959)
- b) - Bestimmung der Gesamtcorticosteroide durch Oxidation zu 17-Ketosteroiden nach Borhydridreduktion oder Wismutatoxidation. Pregnantriol wird hierbei zu Aetiocholanolon oxidiert.
 - quantitative Bestimmung der 17-Ketosteroide

durch die Zimmermann-Farbreaktion
(Gibson und Norymberski, 1954; Appleby et alii,
1955)

c) (Begue et alii (1977) verwandten die auch von uns eingesetzte kapillare Gasflüssigkeitschromatographie, gaben jedoch nur wenige Pregnantriol-Einzelwerte bezüglich der Schwangerschaft an.)

- Solvolyse und enzymatische Hydrolyse
mit β -Glucuronidase aus *Helix pomatia*
- Steroidextraktion mit Äthylacetat und Di-
äthyläther
- Trennung der Steroidfraktionen auf Sephadex-
säulen
- Derivatisierung der Steroide zu Methoxim-
Trimethylsilyläthern
- Gasflüssigkeitschromatographie bei Verwendung
eines Chromatographen mit Flammenionisations-
detektor und beschichteten kapillaren Glas-
säulen.

Die anhand dieser Methoden bisher ermittelten
Normalwerte für Pregnantriol im Schwangerenarn
werden in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tab. 1: Die in der Literatur angegebene, physiologische Pregnantiausscheidung im Schwangerenbarn (mg/24 Std.).
 GW - Gestationswochen; n - Anzahl untersuchter Urine; $\bar{x}$ - Mittelwert;
 SD - Standardabweichung; x_i - Einzelwerte; Bx_i - Bereich von Einzelwerten

Methode	Bildung von Schwefel-säurechromogenen			Wismutatoxidation des Pregnantriols zu Aetio-cholanolon			kapillare Gas-flüssigkeitschromatographie				
	Fotherby u. Love (1960)	Ronan et alii (1960)	Bx _i	Fotherby et alii (1965)	Harkness und Love (1966)	Begue et alii (1977)					
Autoren	n	n	Bx _i	n	$\bar{x}$	SD	n	$\bar{x}$	SD	n	x _i
GW											
5-8											
9-12										1	2,2
13-16											
17-20										1	1,7
21-24										3	1,6;2,1;2,4
25-28										2	1,9;2,1
29-32										2	3,2;3,6
33-36										4	2,6;3,8; 4,0;6,6
37-40										2	3,0;3,2
	7		1,1-4,0	26	1,7	0,8	17	1,8	0,69	2	3,0;3,2
				27	1,4	0,59	31	1,7	0,61	4	2,6;3,8; 4,0;6,6
				29	1,3	0,54	33	1,3	0,51	2	3,2;3,6
				23	1,1	0,42	24	1,0	0,4	2	1,9;2,1
				27	1,2	0,46	9	1,0	0,51	3	1,6;2,1;2,4
				28	1,1	0,37				1	1,7
				24	0,1	0,36				1	2,2
				12	1,1	0,36					

§ 5 Untersuchungsgut

Der Einfachheit halber setzen wir je 4 Gestations-
wochen (=GW) einem Schwangerschaftsmonat (=SSM)
gleich:

GW		SSM		GW	SSM
1- 4	-	1		21-24	6
5- 8	-	2		25-28	7
9-12	-	3		29-32	8
13-16	-	4		33-36	9
17-20	-	5		37-40	10

Auch für die statistischen Auswertungen wurden die
verschiedenen Schwangerschaftsmonate als Untersu-
chungseinheiten angesehen.

Im Zeitraum 3.-10. SSM sammelten 20 gesunde Gravide
je einmal monatlich einen 24-Stunden-Urin. Sämt-
liche Schwangerschaften verliefen komplikations-
los; 10 Mädchen und 10 Jungen wurden zwischen 38.
und 41. Gestationswoche geboren.

So konnten pro Schwangerschaftsmonat 20 Tagesurine
analysiert werden. Aus dem 2. SSM konnten 2 ein-
zelne 24-Stunden-Urine untersucht werden.

Zusätzlich werden die Meßergebnisse bei Auswertung
einzelnr Tagesurine von vier Schwangeren mit behan-

deltem adrenogenitalen Syndrom aufgeführt.

Die Vollständigkeit der Tagesurine wurde durch ausgeschiedene Creatininmengen überprüft.

§ 6 Methode

Knorr arbeitete unter Verwendung der hochspezifischen kapillaren Gasflüssigkeitschromatographie (=cGLC) eine für die routinemäßige Steroidbestimmung im Harn sehr geeignete Methode aus (Knorr, 1982).

Die für die cGLC nötige Derivatisierung der Steroide erfolgt durch die Bildung von Trimethylsilylenoläthern (Chambaz, 1972) im Gegensatz zu den häufig verwendeten Methoxim-Trimethylsilyläthern.

Die Anwendung der cGLC zur Steroidbestimmung im Harn wird in der Literatur auch von Völlmin (1970), German und Horning (1973), Gleispach (1974), Curtius und Völlmin (1975), Holsboer und Knorr (1977), Homoki (1978), Vogt et alii (1979) und Shackleton et alii (1980) beschrieben.

Für die Steroidbestimmung mit cGLC müssen die im Harn größtenteils in konjugierter Form vorliegenden Steroide zunächst durch Hydrolyse freigesetzt werden.

Für die vorliegende Arbeit erfolgten für jeden Tagesurin zwei völlig getrennte Bestimmungen der Steroide durch isolierte Anwendung folgender Enzympräparate:

a) β -Glucuronidase aus *E. coli* (Boehringer, Mannheim)

b) Arylsulfatase/ β -Glucuronidase aus *Helix pomatia* (Boehringer, Mannheim).

Bei der Auswertung der Meßergebnisse muß berücksichtigt werden, daß die β -Glucuronidase lediglich Steroidglucuronide, die Arylsulfatase/ β -Glucuronidase Steroidglucuronide und Steroidsulfate spaltet.

Im Folgenden wird die genaue Meßmethodik beschrieben.

Das Sammeln der 24-Stunden-Urine

Verwendet wurden 2-l-Polyäthylenbehälter mit Schraubverschluß. Zur annähernden Einstellung des Tagesurins auf einen pH von 4 wurden vor dem Sammeln 30 ml einer 10%igen Essigsäure in jede Flasche vorgelegt.

Das Sammeln eines 24-Stunden-Urins erfolgte von morgens 8 Uhr bis zum nächsten Tag 8 Uhr morgens. Nach Abmessen der Harntagesmenge wurden davon jeweils ca. 200 ml bei -20°C eingefroren.

Enzymatische Hydrolyse der Steroidkonjugate

Als Enzyme für die Hydrolyse der Steroidkonjugate kamen für jeden Urin in getrennten Bestimmungen zur Anwendung:

a) β -Glucuronidase aus *E. coli* (Boehringer, Mann-

heim, Best.-Nr. 15240)

b) Arylsulfatase/ β -Glucuronidase aus *Helix pomatia* (Boehringer, Mannheim, Best.-Nr. 127698).
Jeweils 10 ml der 24-Stunden-Urine wurden mit 10%iger Essigsäure und 5%iger Natronlauge auf einen pH von 6 für die β -Glucuronidase bzw. auf einen pH von 4,5 für die Arylsulfatase/ β -Glucuronidase eingestellt. Die pH-Wert-Stabilisierung erfolgte durch Zugabe von 1 ml eines jeweils gleich sauren Acetatpuffers.

Nach Zugabe von 0,15 ml Chloroform zur Hemmung von Bakterienwachstum und von 0,3 ml des entsprechenden Enzympräparates zu jeder Probe wurde die Inkubation über 48 Stunden hinweg bei 37°C vorgenommen.

Ätherextraktion, Waschung und Trocknung

Nach Umfüllen der inkubierten Urine in Glasröhrchen mit Schliff erfolgte pro Urinprobe die Zugabe
1) von 20 ml Diäthyläther und

2) von je 25 μ g in Äthanol gelöstem C22-Alkan (=Docosan) und Cholesterylbutyrat als interne Standards.

Zur Ätherextraktion der freien und freigesetzten Steroide wurden die Röhrchen ca. 20 Minuten massig geschüttelt. Anschließend wurde die wässrige Urinphase abgesaugt und verworfen.

Der verbliebene Ätherextrakt wurde mit 2 ml einer gesättigten Natriumcarbonat-Lösung gewaschen und

durch Abblasen auf ein Volumen von ca. 5 ml eingengt. Dieses Restvolumen wurde über 3 g wasserfreies Natriumsulfat in Spitzröhrchen hinein filtriert und im Luftstrom völlig getrocknet.

In jedem Spitzröhrchen wurden die Steroide mit 1 ml Methanol hinuntergespült. Schließlich wurde das Lösungsmittel bis zur absoluten Trockenheit abgedampft.

Derivatisierung

Zur Silylierung der Steroidhydroxylgruppen zu Trimethylsilylenoläthern wurden jedem Steroidextrakt hinzugefügt:

- 1) ca. 1 mg trockene Kaliumacetat-Kristalle,
- 2) 100 µl MSTFA (=N-methyl-N-trimethyl-silyltrifluoracetamid), (SERVA, Heidelberg), und
- 3) 50 µl Pyridin.

Die Spitzröhrchen wurden mit Schliffstopfen fest verschlossen. Die Silylierung erfolgte über ca. 20 Stunden bei 60°C.

Kapillare Gasflüssigkeitschromatographie (=cGLC)

Von den Reaktionsgemischen wurde mit einer Hamilton-Spritze je 1 µl in kleine u-förmige Kapillartuben übertragen, deren Herstellung aus Glaskapillaren erfolgte (Außendurchmesser: 1,9 mm; wanddicke: 0,19 mm; Höhe: 3 mm).

Ca. 20 Proben gleichzeitig wurden in einem Ölvacuum bei Zimmertemperatur während 15 Minuten getrocknet und anschließend auf den Probenteller eines automatischen Injektors gegeben (automatic sampler for solids, Erba, Milan, Italy). Der Gaschromatograph arbeitet völlig automatisch, für eine Probe benötigt er ca. 1 Stunde Zeit.

Parameter für die cGLC:

GLC-Apparat	DANI-Model 3800
Kapillarsäule	35-m-Glassäule OV 101 innerer Durchmesser: 0,22 mm (Chrompack)
Injektortemperatur	350°C
Detektor	FID, 300°C
Temperaturprogramm	2°/min (190°C-290°C)
Trägergas	H ₂ : 0,8 kg/cm ²
Papiervorschubgeschwindigkeit	200 mm/h
elektronischer Integrator	minigrator, spectra physics

Ein Analysengang des Gaschromatographen umfaßte jeweils 20 Proben in angegebener Reihenfolge:

- 1) 1 Leerwert
- 2) 2 Steroidstandards
- 3) 15 Urinproben
- 4) 2 Steroidstandards.

Die Herstellung eines Steroidstandards erfolgte aus folgenden authentischen Steroiden (zur exakten Ste-

roidnomenklatur s.a. Tab. 5, S. 34):

- a) Androsteron, Aetiocholanolon, Dehydroepiandrosteron, Pregnandiol, Pregnatriol, Pregnatriolon, Pregnentriol, THS, THE, THF und teilweise außerdem aus TH-DCC und THB,
- b) C22-Alkan (=Docosan) und Cholesterylbutyrat als interne Standards.

Ein Steroidstandard enthielt je 25 µg dieser authentischen Steroide (Merck, Darmstadt; SERVA, Heidelberg; Sigma, USA).

Identifizierung von Steroiden im Chromatogramm

Zur Identifizierung der Steroide wurden die Retentionszeiten der authentischen Steroide im Steroidstandard mit denen der aus der jeweiligen Urinprobe isolierten Steroide verglichen.

Quantitative Auswertung

Bei jedem Analysengang wurden Eichfaktoren für die verschiedenen zu untersuchenden Steroide bestimmt. Dazu wurde im Arbeitsstandard das Verhältnis Peakfläche interner Standard (=Cholesterylbutyrat) zur Peakfläche Steroid berechnet.

In der auszuwertenden Urinprobe wurde dagegen das Verhältnis Peakfläche Steroid zur Peakfläche interner Standard (Cholesterylbutyrat) ermittelt.

Die Berechnung der in 24 Stunden ausgeschiedenen Steroidabsolutmengen erfolgte sodann nach folgender Formel:

$$\mu\text{g Steroid}/24 \text{ Std.} = F \times \frac{S}{IS} \times M \times \frac{V}{V_1}$$

wobei

F = Eichfaktor (Peakfläche interner Standard= Cholesterylbutyrat im Steroidstandard/Peakfläche Steroid im Steroidstandard)

S = Peakfläche Steroid in der Probe

IS = Peakfläche interner Standard = Cholesterylbutyrat in der Probe

M = μg zugesetztes authentisches Steroid im Steroidstandard, in unserem Fall = 25 μg

V = 24-Stunden-Harnvolumen in ml

V_1 = eingesetztes Urinvolumen in ml, in unserem Fall 10 ml

bedeuten.

Sensitivität der Methode

In Standardchromatogrammen können 2 ng eines reinen Steroids eindeutig vom Grundrauschen unterschieden werden. Für die routinemäßige Integration der Peaks wurde zweckmäßigerweise eine Empfindlichkeit von 10 ng gewählt (Knorr, 1982).

Für die zu untersuchenden Schwangerenurine re-

sultiert eine untere Empfindlichkeitsgrenze für die tägliche Ausscheidung eines reinen Steroids von ca. 220-230 μg , wenn man berücksichtigt:

- 1) die von Schwangeren durchschnittlich ausgeschiedene Urinmenge von 1500 ml/24Std.
- 2) die Verdünnung der Steroide einer Probe in 150 μl
- 3) die Aufgabe von nur 1 μl einer solchen Verdünnung.

§ 7 Zuverlässigkeitskriterien

Bei Laboruntersuchungen besteht die Gefahr der Ergebnisverfälschung durch Fehler beim Sammeln der Proben, ihrer Aufbewahrung und Verarbeitung.

Deswegen ist die Kenntnis der Zuverlässigkeit der von uns verwendeten Methode zur Bestimmung von Pregnantriol und Pregnantriolon im Urin für die Ergebnisbeurteilung sehr wichtig. Die Zuverlässigkeit einer Methode ist von mehreren Faktoren abhängig, wobei uns quantitative vorrangig interessieren. Im Folgenden werden die wichtigsten Zuverlässigkeitskriterien diskutiert.

Richtigkeit (accuracy)

Die exakte quantitative Wiederauffindung der tatsächlich im Urin vorhandenen Steroidmengen stellt die Grundlage für die Richtigkeit der Methode dar. Durch ihre Überprüfung soll der systematische Fehler ausgeschaltet werden. Zur Kontrolle wurden Wiederauffindungsversuche durchgeführt.

Zu Urinproben, die weder Pregnantriol noch Pregnantriolon enthielten, wurden diese beiden Steroide in Form von in Äthanol gelösten Referenzsteroiden hinzugefügt.

Präzision (precision)

Unter Präzision als Maß für den zufälligen Fehler versteht man die Genauigkeit einer Meßmethode; es wird die Streuung mehrerer Messungen der gleichen Probe betrachtet.

Bei Verwendung des Enzyms β -Glucuronidase erfolgte die Präzisionserfassung durch Doppelbestimmungen. Pregnantriol wurde in jeder Urinprobe doppelt bestimmt, wobei 2 Parallelansätze einer Urinprobe mit der gesamten Methode aufgearbeitet wurden. Standardabweichung und Variationskoeffizient wurden für die verschiedenen Schwangerschaftsmonate getrennt berechnet nach:

$$1) \quad s = \sqrt{\frac{\sum (x_1 - x_2)^2}{2n}} \quad (\text{Sachs, S. 78-79})$$

$$2) \quad \text{VK} = \frac{s \times 100}{\bar{x}} \quad \%$$

wobei

x_1 und x_2 = Doppelergebnisse für Pregnantriol von einer Urinprobe

n = Anzahl der untersuchten Urinproben

$$\bar{x} = \frac{\frac{x_1 + x_2}{2}}{n}$$

bedeuten.

Tab. 3: Präzision der Pregnantrioldoppelbestimmungen in einer Urinprobe.
 Enzymatische Hydrolyse durch β -Glucuronidase.
 n = 20 untersuchte Urinproben pro Schwangerschaftsmonat; GW - Gestationswochen;
 SD - Standardabweichung ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$); VK - Variationskoeffizient

GW	9-12	13-16	17-20	21-24	25-28	29-32	33-36	37-40
SD	144	89	73	108	76	115	126	224
VK %	25	19	16	23	19	21	18	20

Errechnet wurde ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 20%.

Bei Verwendung des Enzympräparates Arylsulfatase/ β -Glucuronidase dienten Mehrfachbestimmungen von Pregnantriol und Pregnantriolon der Präzisionserfassung. Dabei wurde ein aus mehreren Tagesurinen gemixter Poolurin in 15 verschiedenen Analysengängen wiederholt auf seinen Gehalt an Pregnantriol und Pregnantriolon untersucht.

Berechnet wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (Formeln siehe §9, S. 36).

Tab. 4: Präzision der Mehrfachbestimmungen von Pregnantriol und Pregnantriolon in einem Poolurin in getrennten Analysengängen. Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/ β -Glucuronidase.
 n - Anzahl der Mehrfachbestimmungen; $\bar{x}$ - Mittelwert; SD - Standardabweichung; VK - Variationskoeffizient

	n	$\bar{x}$ ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$)	SD ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$)	VK %
Pregnantriol	15	22624	2156	9,5
Pregnantriolon	15	7169	836	11,7

Vergleicht man die für die verschiedenen Enzympräparate resultierenden Variationskoeffizienten der Pregnantriolwerte miteinander, liegt die Präzision bei Verwendung der Arylsulfatase/ β -Glucuronidase mit einem Variationskoeffizienten von 9,5% deutlich höher als diejenige bei Verwendung der β -Glucuronidase mit einem Variationskoeffizienten von durchschnittlich 20%.

Spezifität

Unter der Spezifität versteht man die Erfassung einer bestimmten chemischen Substanz unter Ausschluß anderer.

Die Spezifität der von uns angewandten Methode ist gegeben durch die Derivatisierung der einzelnen

Steroide und der anschließenden hochdifferenzierenden kapillaren Gasflüssigkeitschromatographie.

§ 8 Abbildung einiger typischer Chromatogramme

Bei allen Abbildungen handelt es sich um Chromatogramme, die durch kapillare Gasflüssigkeitschromatographie gewonnen wurden. Die Steroide wurden dabei zu Trimethylsilylenoläthern derivatisiert. Die Urinprobenchromatogramme stammen aus der Versuchsreihe mit Verwendung des Enzympräparates Arylsulfatase/ β -Glucuronidase.

Zur genauen Steroidnomenklatur mit Abkürzungen der in dieser Arbeit erwähnten Steroide siehe auch Tab. 5, S. 34).

Zu erwähnen ist, daß die phenolischen Östrogene durch das Waschen des Ätherextrakts mit Natriumcarbonat weitgehend entfernt werden sollten. Das Auftreten von Peaks, die Östron, Östradiol-17 β und Östriol entsprechen, zeigt jedoch an, daß die Elimination der Östrogene durch die Alkaliwäsche nicht vollständig war.

Zur Identifizierung von Östron, Östradiol-17 β und Östriol wurde nachträglich ein einziger Analysengang vorgenommen, dessen Steroidstandards die authentischen Steroide Östron, Östradiol-17 β und Östriol enthielten (Ergebnisse siehe §12, S. 60).

Da die abgebildeten Chromatogramme der Urinste-

roide von Schwangeren jedoch nicht zu diesem Analysengang gehören, können Östron, Östradiol-17 β und Östriol in ihnen zwar durch Vergleich der Retentionszeiten identifiziert, aber nicht genau quantifiziert werden.

Abb. 1: Chromatogramm von authentischen Standardsteroiden (160ng/Peak) bei Anwendung der cGLC.
 1 - C22 = interner Standard; 2 - Androsteron;
 3 - Aetiocholanolon; 4 - Dehydroepiandrosteron;
 7 - Pregnandiol; 8 - Pregnantriol; 10 - Pregnantriolon;
 11 - Pregnentriol; 12 - THS;
 13 - TH-DOC; 14 - THE; 15 - THF; 16 - THB;
 17 - Cholesterylbutyrat = interner Standard

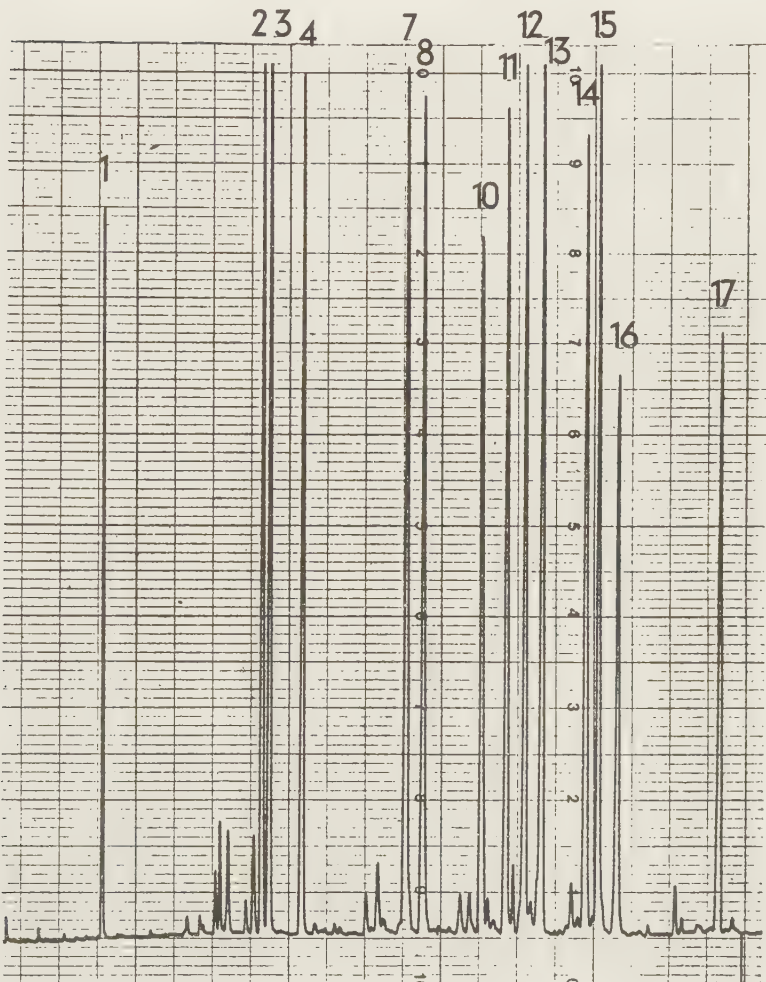


Abb. 2: Typisches Chromatogramm eines Schwangeren-
harns aus dem Zeitraum 9.-12. Gestations-
woche (1400ml/die) bei Anwendung der cGLC.
Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/
 β -Glucuronidase.
2 - Androsteron (338 μ g/die); 3 - Aetiochola-
nolon (771 μ g/die); 7 - Pregnandiol (5964
 μ g/die); 8 - Pregnantriol (498 μ g/die); 14 -
THE (417 μ g/die).
Zur Numerierung der übrigen Peaks siehe
Tab. 5, S. 34.

7

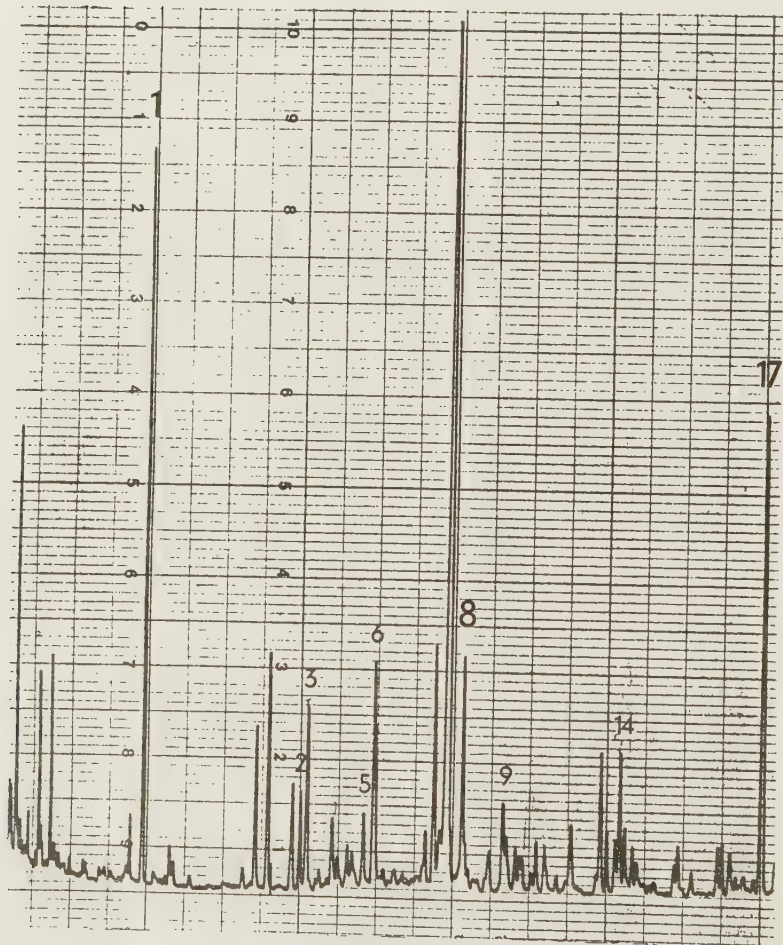


Abb. 3: Typisches Chromatogramm eines Schwangeren-
harns aus dem Zeitraum 21.-24. Gestations-
woche (910ml/die) bei Anwendung der cGLO.
Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/
 β -Glucuronidase.
2 - Androsteron (300 μ g/die); 3 - Aetiochola-
nolon (504 μ g/die); 7 - Pregnandiol (10110
 μ g/die); 8 - Pregnantriol (786 μ g/die);
14 - THE (2095 μ g/die).
Zur Numerierung der übrigen Peaks siehe
Tab. 5, S. 34.

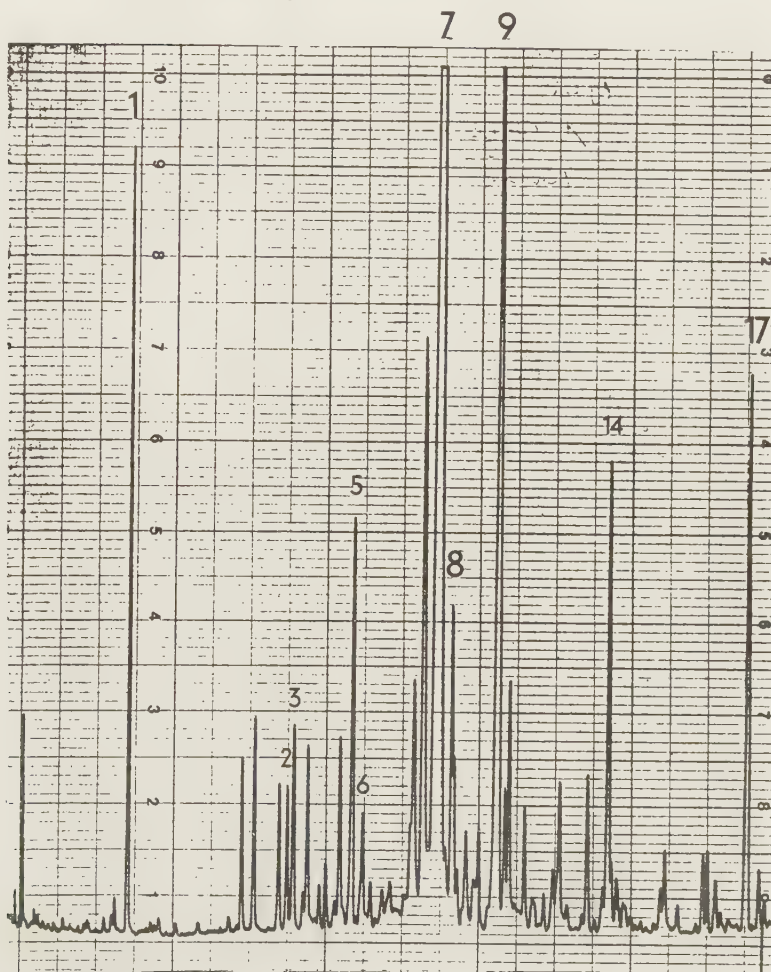


Abb. 4: Typisches Chromatogramm eines Schwangeren-
harns aus dem Zeitraum 37.-40. Gestations-
woche (1580ml/die) bei Anwendung der cGLC.
Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/
 β -Glucuronidase.

2 - Androsteron (442 μ g/die); 4 - Dehydro-
epiandrosteron (1582 μ g/die); 7 - Pregnan-
diol (35787 μ g/die); 8 - Pregnantriol
(2787 μ g/die); 10 - Pregnantriolon (987 μ g/
die), jedoch fraglich, siehe auch §11;
12 - THS (1294 μ g/die); 14 - THE (1872 μ g/
die).

Zur Numerierung der übrigen Peaks siehe
Tab. 5, S. 34.

7 9

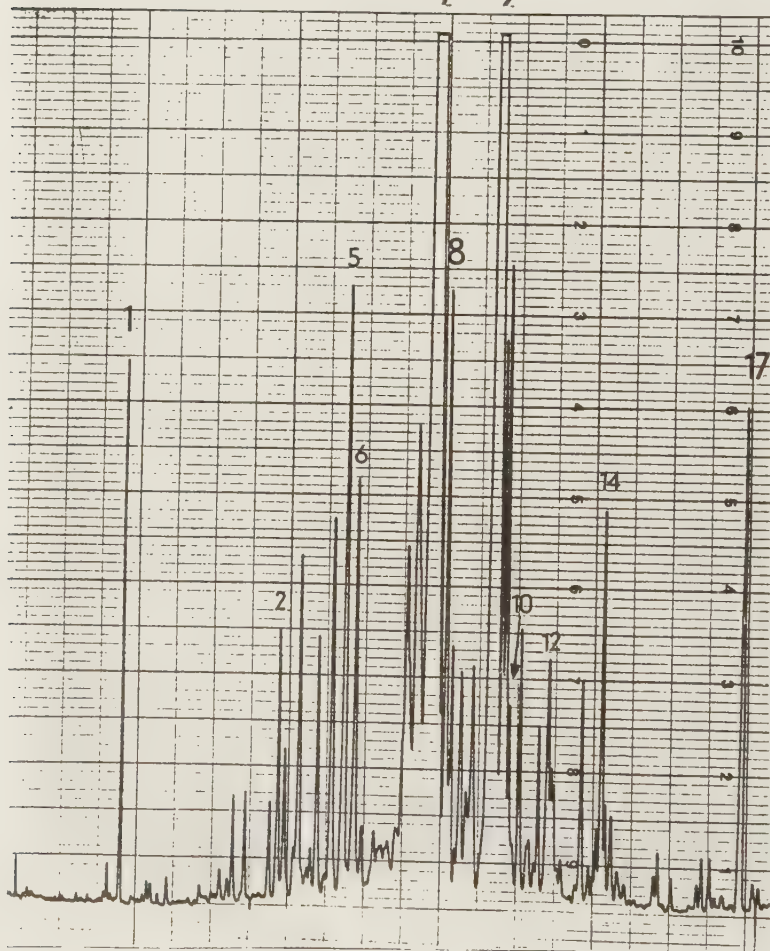
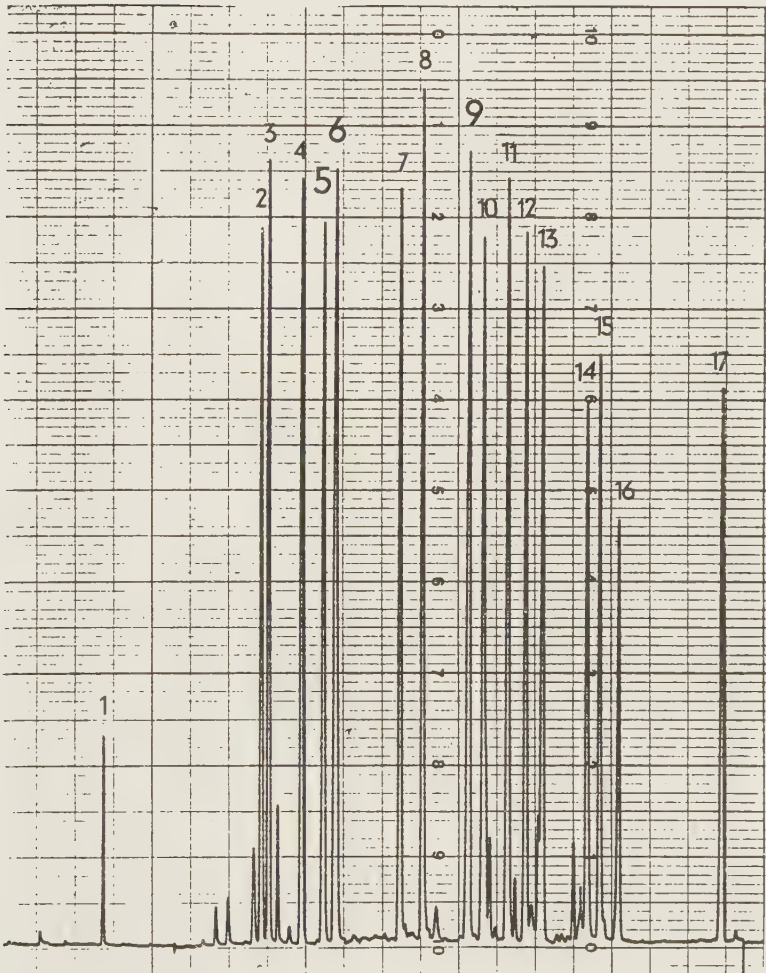


Abb. 5: Chromatogramm von authentischen Standardsteroiden (160ng/Peak) einschließlich Östrogenen bei Anwendung der cGLC.
5 - Östron; 6 - Östradiol-17 β ; 9 - Östriol.
Zur Numerierung der übrigen Peaks siehe Tab. 5, S. 34.



Tab. 5: Steroidnomenklatur;

Trivialnamen, Abkürzungen und systematische Bezeichnungen.

(Die voranstehenden Zahlen beziehen sich auf die Nummerierung der Peaks in den abgebildeten Chromatogrammen.)

- 3 Aetiocholanolon
3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-on
- 2 Androsteron
3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-on
- 1 C22- Alkan (=Docosan)
interner Standard, IS
- 17 Cholesterylbutyrat, CHB
interner Standard, IS
- 4 Dehydroepiandrosteron, DHA
5-androsten-3 β -ol-17-on

21-Desoxycortisol
11 β ,17-dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion
17-Hydroxypregnanolon
3 α ,17 α -dihydroxy-5 β -pregnan-20-on
17-Hydroxypregnenolon
3 α ,17 α -dihydroxy-5 β -pregnen-20-on
17-Hydroxyprogesteron, 17-CH-F
17 α -hydroxy-4-pregnen-3,20-dion
- 5 Östron, E₁
3-hydroxy-oestra-1,3,5(10)-trien,17-on

Forts. Tab.5 :

- 6 Östradiol-17 β , E₂
oestra-1,3,5(10)-trien,3,17 β -diol
- 9 Östriol, E₃
oestra-1,3,5(10)-trien,3,16 α ,17 β -triol
- 7 Pregnandiol, P.diol
5 β -pregnan-3 α ,20 α -diol
- 8 Pregnantriol, P.triol
5 β -pregnan-3 α ,17 α ,20 α -triol
- 10 Pregnantriolon, P.triolon
3 α ,17 α ,20 α -trihydroxy-5 β -pregnan-11-on
Pregnenolon
3 α -hydroxy-5 β -pregnen-20-on
- 11 Pregnentriol
5-pregnen-3 β ,17 α ,20 α -triol
Progesteron
4-pregnen-3,20-dion
- 16 Tetrahydrocorticosteron, THB
5 β -pregnan-3 α ,11 β ,21-triol-20-on
- 15 Tetrahydrocortisol, THF
5 β -pregnan-3 α ,11 β ,17 α ,21-tetrol-20-on
- 14 Tetrahydrocortison, THE
5 β -pregnan-3 α ,17 α ,21-triol-11,20-dion
- 13 Tetrahydro-11-desoxycorticosteron, TH-DCC
5 β -pregnan-3 α ,21-diol-20-on
- 12 Tetrahydro-11-desoxycortisol, THS
5 β -pregnan-3 α ,17 α ,21-triol-20-on

§ 9 Angewandte statistische Methoden

Sämtliche Berechnungen und Signifikanzanalysen erfolgten auf dem Rechner pdp 11 (Digital Equipment, int. ltd., Galway, Ireland).

Für die statistischen Auswertungen der Versuchsergebnisse kamen zur Anwendung:

1) Mittelwert
$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

2) Standardabweichung
$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

3) Standardabweichung
des Mittelwertes
(=SEM)
$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

4) Varianz
$$s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

5) Prüfung auf Normalverteilung

6) Prüfung auf Varianzgleichheit. Die Nullhypothese besagt, daß zwei unabhängig voneinander gewonnene und normalverteilte Stichproben einer gemeinsamen Grundgesamtheit angehören.

Bei uns erfolgte die Anwendung beim Vergleich

a) der Ergebnisse für das Enzympräparat B-Glucuronidase mit den Ergebnissen für das Enzympräparat Arylsulfatase/B-Glucuronidase im gleichen Schwangerschaftsmonat

b) der Ergebnisse bei weiblichen Feten mit den Ergebnissen bei männlichen Feten im gleichen Schwangerschaftsmonat.

- 7) T-Test nach Student für unverbundene Daten. Die Nullhypothese besagt, daß sich die Mittelwerte zweier unabhängiger und normalverteilter Grundgesamtheiten bei gegebener Varianzgleichheit ebenfalls gleichen.
Die Anwendung erfolgte wie unter 6) beschrieben bei Normalverteilung und Varianzgleichheit der zu vergleichenden Stichproben.
- 8) U-Test nach Mann-Whitney. Die Nullhypothese besagt, daß sich die Verteilungsfunktionen zweier unabhängiger Stichproben gleichen.
Die Anwendung erfolgte wie unter 6) beschrieben, falls a) keine Normalverteilung oder b) keine Varianzgleichheit bei Normalverteilung der zu vergleichenden Stichproben vorlagen.
- 9) Friedman-Test = Rangvarianzanalyse, d.h. verteilungsabhängiger Vergleich mehrerer abhängiger Stichproben von Meßwerten hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz.
Der Test prüft bezüglich des Verlaufs der Schwangerschaft, ob die in den verschiedenen Schwangerschaftsmonaten ermittelten Stichproben einer gemeinsamen Grundgesamtheit angehören.
- 10) Multiple Vergleiche abhängiger Stichproben nach Wilcoxon-wilcox. Nach Anwendung des Friedman-Tests überprüfen diese multiplen Vergleiche bestehende Unterschiede zwischen den abhängigen

Stichproben auf Signifikanz. In unserem Fall werden also die Unterschiede zwischen den verschiedenen Schwangerschaftsmonaten charakterisiert.

Die Nullhypothese besagt, daß die zu vergleichenden abhängigen Stichproben keine signifikanten Unterschiede aufweisen.

Die Signifikanzschränken für die Prüfung auf Varianzgleichheit, den T- und U-Test, die Schwellenwerte für den Friedman-Test und die kritischen Differenzen für den Test nach Wilcoxon-Wilcox wurden den entsprechenden Tabellen in "Angewandte Statistik" von I. Sachs entnommen.

Der in den folgenden Betrachtungen verwendete Ausdruck " $2p < x$ " besagt, daß bei zweiseitiger Prüfung die jeweilige Nullhypothese auf einem Signifikanzniveau von x verworfen wird.

§ 10 Die Pregnantriolausscheidung im Verlauf
der Schwangerschaft

Die Auswertung der Meßergebnisse für Pregnantriol im Schwangerenurin wurde durch Orientierung an folgenden thematischen Gesichtspunkten vorgenommen:

- a) Das Verhalten der ausgeschiedenen Pregnantriol-Tagesmengen im Verlauf der Schwangerschaft
- b) Vergleichende Betrachtung der durch die Enzympräparate β -Glucuronidase und Arylsulfatase/ β -Glucuronidase gewonnenen Meßergebnisse
- c) Differenzierung der Ergebnisse bei retrospektiver Berücksichtigung des Geschlechts der Feten.

1) Tabellarische Aufführung der Meßergebnisse

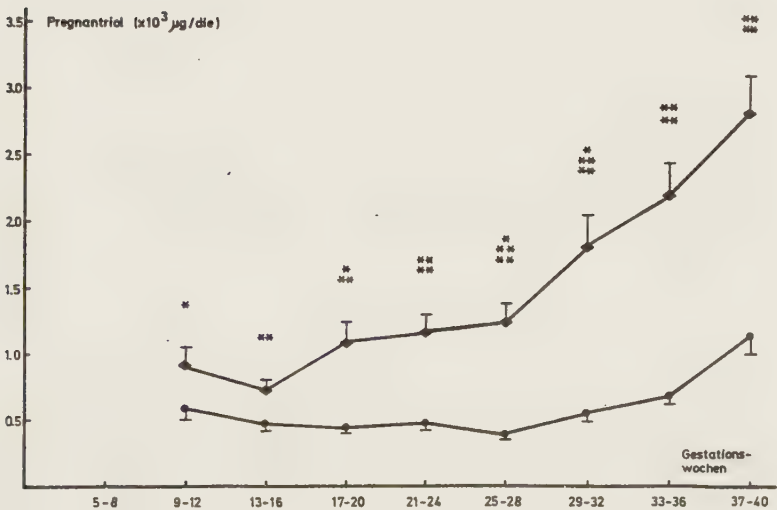
Tab. 6: Pregnantriolausscheidung im Schwangeren-
harn ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$).
Ergebnisse nach getrennter Anwendung zweier
verschiedener Enzympräparate zur Hydro-
lyse.
GW - Gestationswochen; n - Anzahl unter-
suchter Urine; $\bar{x}$ - Mittelwert; SD - Stan-
dardabweichung; NV - Normalverteilung

GW	n	β -Glucuronidase aus E. coli			Arylsulfatase/ β -Glucuronidase aus Helix pomatia		
		$\bar{x}$	SD	NV	$\bar{x}$	SD	NV
5-8	2	555	-	-	1873	-	-
9-12	20	578	292	nein	921	556	ja
13-16	20	465	157	nein	733	323	ja
17-20	20	447	186	ja	1091	680	nein
21-24	20	479	227	ja	1171	553	ja
25-28	20	394	155	ja	1246	607	ja
29-32	20	555	259	nein	1827	998	ja
33-36	20	685	263	ja	2206	1076	ja
37-40	20	1143	553	ja	2838	1190	ja

2) Graphische Darstellung der für die beiden Enzympräparate unterschiedlichen Ergebnisse

Abb. 6: Gemessene Pregnantriolmengen im Schwangerenurin ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$) nach isolierter Anwendung des Enzympräparates β -Glucuronidase und des Enzympräparates Arylsulfatase/ β -Glucuronidase zur Hydrolyse. Markierung von signifikanten Unterschieden zwischen beiden Meßreihen. Eingezeichnet sind die Mittelwerte mit SEM bei $n = 20$ sowie die nach U-Test bei zweiseitiger Betrachtung ermittelten Signifikanzniveaus.

- - β -Gluc. aus E. coli
- ◆ - Arylsulf./ β -Gluc. aus H. pom.
- * - $2p < 0,02$
- ** - $2p < 0,005$
- *** - $2p < 1 \times 10^{-4}$
- **** - $2p < 1 \times 10^{-5}$
- ***** - $2p < 1 \times 10^{-6}$



Zur Hydrolyse der im Harn vorliegenden Steroidkonjugate wurden zwei Enzympräparationen getrennt voneinander eingesetzt. Die β -Glucuronidase aus *E. coli* spaltet lediglich Steroidglucuronide, die Arylsulfatase/ β -Glucuronidase aus *Helix pomatia* jedoch Steroidglucuronide und -sulfate.

Die vorliegende Abbildung verdeutlicht, daß die Gesamtmenge freigesetzten Pregnantriols bei Anwendung der Arylsulfatase/ β -Glucuronidase in allen Schwangerschaftsmonaten signifikant höher war als bei Anwendung der β -Glucuronidase.

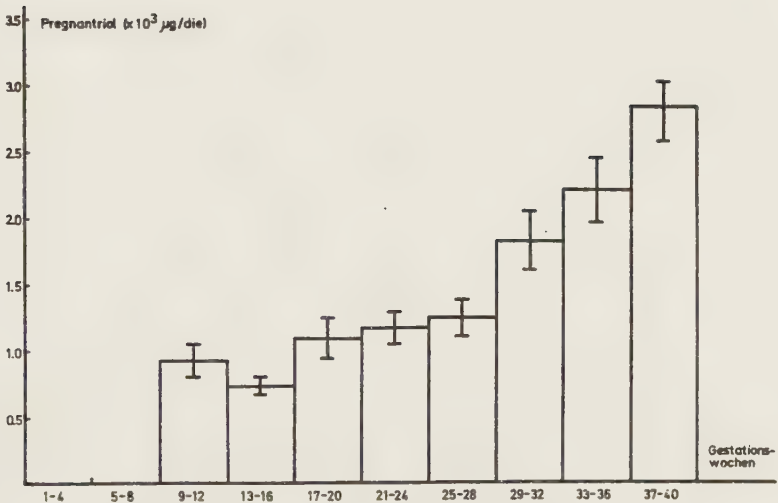
Dieses Ergebnis weist auf einen hohen Anteil von Steroidsulfaten im Schwangerenharn hin.

Der in Sulfatform vorliegende Anteil des Pregnantriols betrug im Vergleich zur Gesamtmenge des freien, sulfatierten und glucuronidierten Pregnantriols im 3. Schwangerschaftsmonat (=SSM) 37%, im 4. SSM 37%, im 5. SSM 59%, im 6. SSM 59%, im 7. SSM 68%, im 8. SSM 70%, im 9. SSM 69% und im 10. SSM 60%.

Ab 5. SSM bis 10. SSM übertraf der sulfatierte Anteil des Pregnantriols den glucuronidierten Anteil der im Harn ausgeschiedenen Pregnantriol-Gesamtmenge.

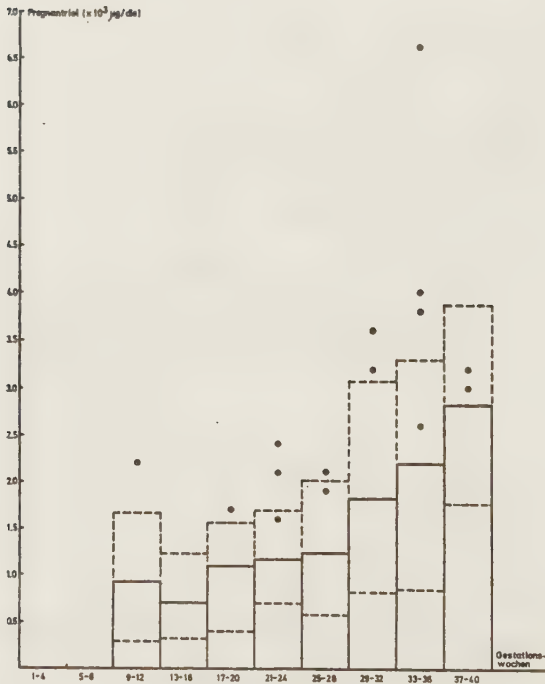
3) Graphische Darstellung der Ausscheidung von
Pregnantriol im Verlauf der Schwangerschaft
als Gesamtmenge von Sulfaten und Glucuroniden

Abb. 7: Pregnantriolausscheidung im Schwangeren-
harn ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$).
Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/
 β -Glucuronidase.
Eingezeichnet sind die Mittelwerte mit
SEM bei $n=20$.



- 4) Graphische Darstellung der mittleren Fregnantriolausscheidung mit 10. und 90. Perzentile sowie mit den von Begue 1978 ermittelten Einzelwerten zum Vergleich

Abb. 8: Fregnantriolausscheidung im Schwangeren-harn ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$).
Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/
B-Glucuronidase.
Eingezeichnet sind:
a) ——— - die Mittelwerte, $n=20$
b) - - - - - unterhalb des Mittelwertes
 - - - - - die 10. Perzentile
 - - - - - oberhalb des Mittelwertes
 - - - - - die 90. Perzentile
c) ● - die von Begue ebenfalls durch
 cGLC ermittelten 15 Einzelwerte



5) Das Verhalten der ausgeschiedenen Pregnantriol-mengen im Verlauf der Schwangerschaft

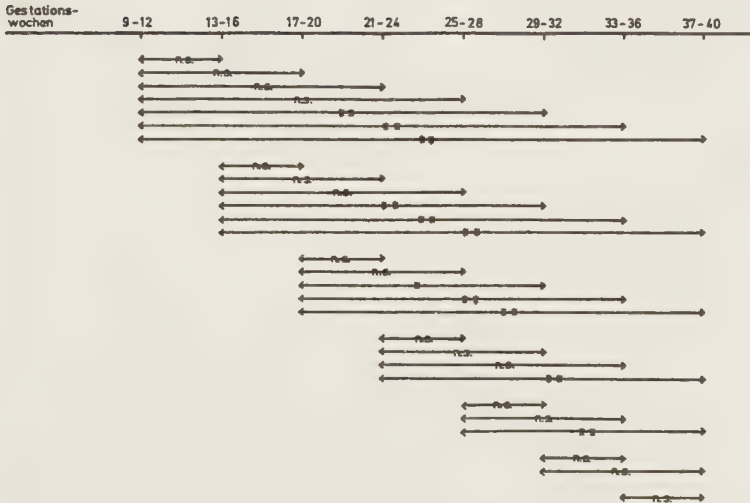
Abb. 9: Darstellung signifikanter Unterschiede zwischen den Pregnantriol-Ausscheidungsmengen verschiedener Schwangerschaftsmonate, ermittelt durch den Friedman-Test und multiple Vergleiche nach Wilcoxon-Wilcoxon. Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/ β -Glucuronidase.

n - 20 untersuchte Urine pro Monat

ns - nicht signifikant

* - $2p < 0,05$

** - $2p < 0,01$



Aus der Abbildung geht bei Berücksichtigung der absoluten Meßergebnisse (siehe Tab. 6, S. 40) hervor, daß ab 29.-32. Woche, also ab Beginn des 3. Trimenons, die ausgeschiedenen Fregnantriolmengen signifikant höher lagen als die in der 9.-20. woche eliminierten Fregnantriolmengen.

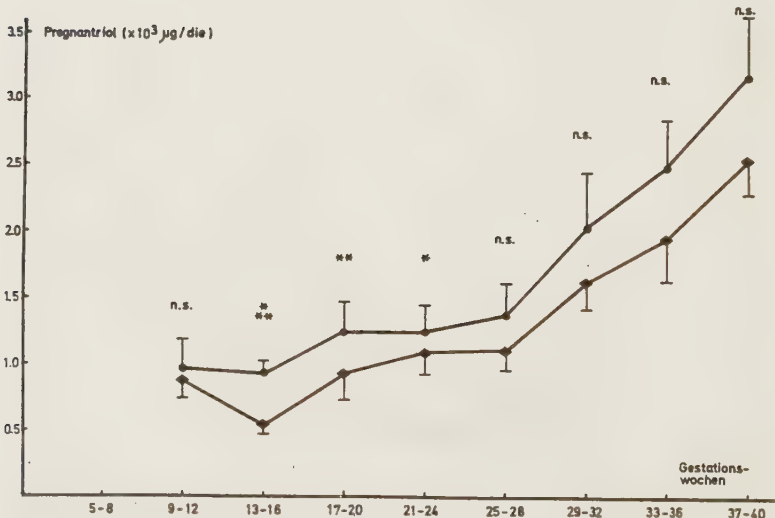
Außerdem übertrafen die Ergebnisse der Wochen 37-40 signifikant diejenigen der Wochen 9-28, was gleichbedeutend mit einem signifikanten Anstieg innerhalb des 3. Trimenons ist.

Der individuelle Verlauf der Fregnantriolausscheidung während der Schwangerschaft zeigte bei fast allen untersuchten Graviden ein Absinken innerhalb des ersten Trimenons sowie einen annähernd kontinuierlichen Anstieg ab 13.-16. Woche bis zum Ende der Schwangerschaft (siehe Abb.10, S. 47).

6) Vergleichende Betrachtung der ausgeschiedenen
Pregnantriolmengen bei Berücksichtigung des fe-
talen Geschlechts

Abb. 11: Ausgeschiedene Pregnantriolmengen im Schwan-
gerenharn ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$) bei weiblichen bzw.
männlichen Feten.
Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/
 β -Glucuronidase.
Markierung signifikanter Unterschiede der
verschiedenen Ausscheidungskurven.
Eingezeichnet sind die Mittelwerte mit SEM
bei $n=10$ für weibliche und $n=10$ für
männliche Feten sowie die nach T- bzw.
U-Test bei zweiseitiger Betrachtung er-
mittelten Signifikanzniveaus.

- - weibliche Feten
- ◆ - männliche Feten
- ns - nicht signifikant
- * - $2p < 0,5$ (U-Test)
- ** - $2p < 0,2$ (U-Test)
- *** - $2p < 0,01$ (T-Test)



Aus der Abbildung geht hervor, daß die durchschnittliche mütterliche Pregnantriolausscheidung bei weiblichen Feten zwar in allen Schwangerschaftsmonaten höher war als bei männlichen Feten, signifikante Unterschiede jedoch nur in der Mitte der Schwangerschaft (13.-24. Woche) bestanden.

§ 11 Die Pregnantriolonausscheidung im Verlauf der Schwangerschaft

Für Pregnantriolon konnte die Peakzuordnung durch den Vergleich der Retentionszeiten im Standard- und Probenchromatogramm nur unter äußerstem Vorbehalt vorgenommen werden.

Ein dem Pregnantriolon eventuell entsprechender Peak konnte erst ab Beginn des 6. Schwangerschaftsmonats beobachtet werden.

Ein solcher Peak erschien jedoch stets nur in der Nähe der für Pregnantriolon üblichen Retentionszeit und außerdem unscharf getrennt von den ihm benachbarten Peaks anderer Steroide.

Die dennoch durchgeführte Auswertung dieser kleinen Peaks erbrachte die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse durch Orientierung an folgenden thematischen Gesichtspunkten:

- a) Das Verhalten der ausgeschiedenen Pregnantriolon-Tagesmengen im Verlauf der Schwangerschaft
- b) Vergleichende Betrachtung der durch die Enzympräparate β -Glucuronidase und Arylsulfatase/ β -Glucuronidase gewonnenen Ergebnisse
- c) Differenzierung der Ergebnisse bei retro-

spektiver Berücksichtigung des Geschlechts der
Feten.

1) Tabellarische Aufführung der Meßergebnisse

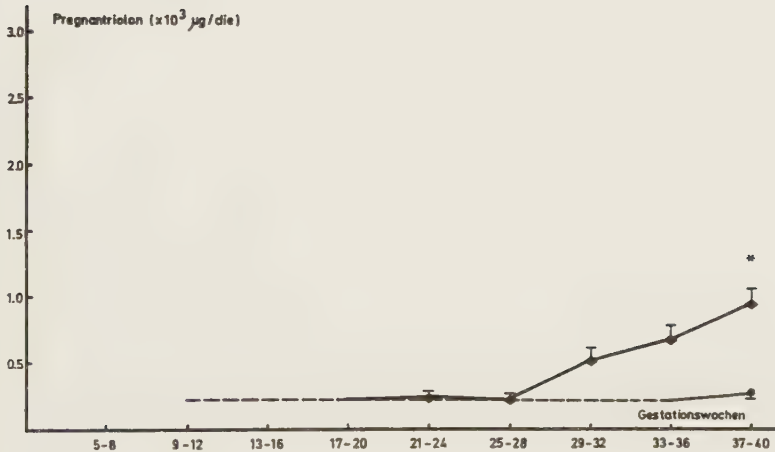
Tab. 7: Pregnantriolonausscheidung im Schwangeren-
harn ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$).
Ergebnisse nach getrennter Anwendung zweier
verschiedener Enzympräparate zur Hydro-
lyse.
GW - Gestationswochen; n - Anzahl unter-
suchter Urine; $\bar{x}$ - Mittelwert; SD - Stan-
dardabweichung; NV - Normalverteilung

GW	n	β -Glucuronidase aus <i>E. coli</i>			Arylsulfatase/ β -Glucuronidase aus <i>Helix pomatia</i>		
		$\bar{x}$	SD	NV	$\bar{x}$	SD	NV
5- 8	2	≤ 225	-	-	≤ 225	-	-
9-12	20	≤ 225	-	-	≤ 225	-	-
13-16	20	≤ 225	-	-	≤ 225	-	-
17-20	20	≤ 225	-	-	≤ 225	-	-
21-24	20	≤ 225	-	-	250	150	ja
25-28	20	≤ 225	-	-	236	155	ja
29-32	20	≤ 225	-	-	528	411	ja
33-36	20	≤ 225	-	-	689	444	ja
37-40	20	271	188	ja	951	550	ja

2) Graphische Darstellung der für die beiden Enzympräparate unterschiedlichen Ergebnisse

Abb. 12: Gemessene Pregnantriolonmengen im Schwangerenurin ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$) nach isolierter Anwendung des Enzympräparates β -Glucuronidase und des Enzympräparates Arylsulfatase/ β -Glucuronidase zur Hydrolyse. Markierung von signifikanten Unterschieden zwischen beiden Meßreihen. Eingezeichnet sind die Mittelwerte mit SEM bei $n=20$ sowie die nach U-Test bei zweiseitiger Betrachtung ermittelten Signifikanzniveaus.

- - β -Glucuronidase aus *E. coli*
- ◆ - Arylsulf./ β -Gluc. aus *H. pom.*
- * - $2p < 2 \times 10^{-5}$
- - - - untere Nachweisgrenze von $225\mu\text{g}/24\text{Std.}$



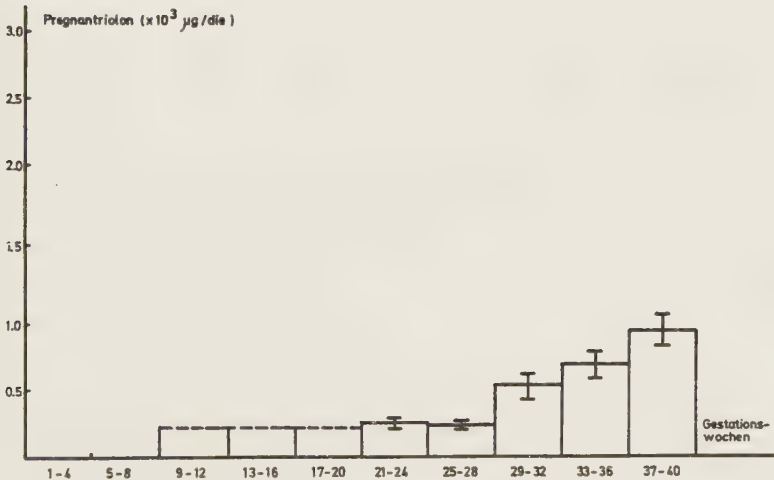
Bei Anwendung der Arylsulfatase/ β -Glucuronidase wurde die untere Nachweisgrenze für die tägliche Pregnantriolonmenge ($225\mu\text{g}/24\text{Std.}$) ab der 21.-24. Schwangerschaftswoche, bei Anwendung der β -Glucuronidase nur in den Wochen 37-40 überschritten.

Die Meßergebnisse für Pregnantriolon lagen im letzten Schwangerschaftsmonat nach enzymatischer Hydrolyse durch Arylsulfatase/ β -Glucuronidase signifikant höher als nach Hydrolyse durch β -Glucuronidase.

Im letzten Schwangerschaftsmonat betrug der in Sulfatform vorliegende Anteil des Pregnantrilons im Vergleich zur Gesamtmenge des freien, sulfatierten und glucuronidierten Pregnantrilons 72% und übertraf damit den glucuronidierten Anteil der im Harn ausgeschiedenen Pregnantriolon- Gesamtmenge.

3) Graphische Darstellung der Ausscheidung von
Pregnantriolon im Verlauf der Schwangerschaft
als Gesamtmenge von Sulfaten und Glucuroniden

Abb. 13: Pregnantriononausscheidung im Schwangeren-
harn ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$).
Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/
 β -Glucuronidase.
Eingezeichnet sind die Mittelwerte mit
SEM bei $n=20$.
--- - untere Nachweisgrenze von
 $225\mu\text{g}/24\text{Std.}$



4) Das Verhalten der ausgeschiedenen Pregnantriolomengen im Verlauf der Schwangerschaft

Abb. 14: Darstellung signifikanter Unterschiede zwischen den Pregnantriolon-Ausscheidungsmengen verschiedener Schwangerschaftsmonate, ermittelt durch den Friedman-Test und multiple Vergleiche nach Wilcoxon-Wilcox.

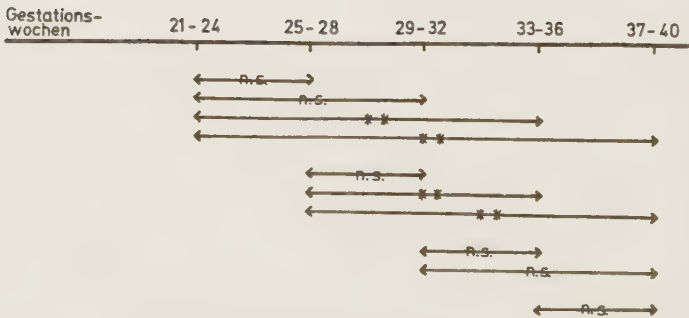
Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/ β -Glucuronidase.

(Beachte: die untere Nachweisgrenze für Pregnantriolon wurde erst ab 6. Monat überschritten.)

n - 20 untersuchte Urine pro Monat

ns - nicht signifikant

* * - $2p < 0,01$

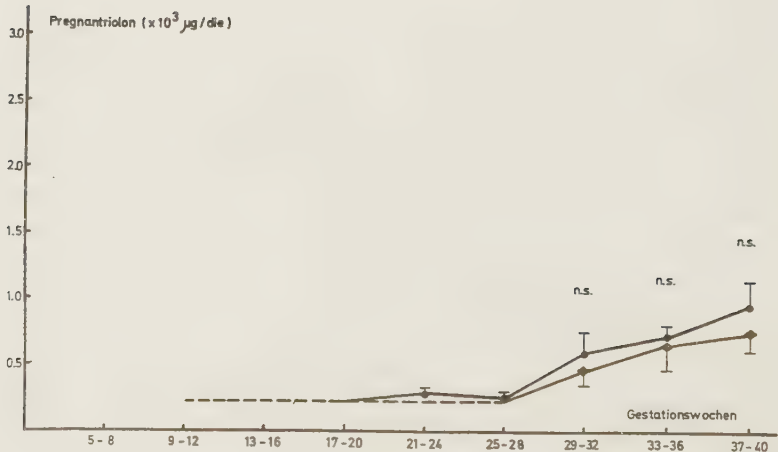


Aus der Abbildung geht bei Berücksichtigung der absoluten Meßergebnisse (siehe Tab. 7, S. 52) hervor, daß die ab 33. Schwangerschaftswoche täglich ausgeschiedenen Pregnantriolonmengen signifikant höher lagen als die bis zur 28. Woche ausgeschiedenen. Das ist gleichbedeutend mit einem signifikanten Anstieg innerhalb des 3. Trimenons.

5) Vergleichende Betrachtung der ausgeschiedenen Pregnantriolonmengen bei Berücksichtigung des fetalén Geschlechts

Abb. 15: Ausgeschiedene Pregnantriolonmengen im Schwangerenarn ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$) bei weiblichen bzw. männlichen Feten. Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/ β -Glucuronidase. Vergleich durch Anwendung von U- bzw. T-Test. Eingezeichnet sind die Mittelwerte mit SEM bei $n=10$ für weibliche und $n=10$ für männliche Feten.

- - weibliche Feten
- ◆ - männliche Feten
- ns - nicht signifikant
- - - - untere Nachweisgrenze von $225\mu\text{g}/24\text{Std.}$



Bei Berücksichtigung des fetalen Geschlechts ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der mütterlichen Pregnantriolonausscheidung.

§ 12 Nebenergebnisse bei Auswertung der Chromatogramme

Pregnandiol

Bei der Steroidbestimmung durch die unter §6 erläuterte Methode fielen besonders die im Verlauf der Schwangerschaft zunehmend ausgeschiedenen Pregnandiolmengen auf.

Tab. 8: Pregnandiolausscheidung im Schwangeren-harn ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$).
Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/ β -Glucuronidase.
GW - Gestationswochen; n - Anzahl untersuchter Urine; $\bar{x}$ - Mittelwert; SD - Standardabweichung

GW	n	$\bar{x}$	SD
9-12	20	5300	1516
13-16	20	7139	2424
17-20	20	9341	4096
21-24	20	11285	2508
25-28	20	13918	3309
29-32	20	23443	8976
33-36	20	24289	6418
37-40	20	23077	6570

Da sich die Peaks für Pregnandiol und 17-Hydroxy-Pregnanolon in den Chromatogrammen überlappen, muß mit Ungenauigkeiten der angeführten Pregnandiol-

werte gerechnet werden.

Pregnandiol als wichtigstes Abbau- und Ausscheidungsprodukt des von der Placenta in großen Mengen sezernierten Progesterons (Klopper und Michie, 1956) wurde im Schwangerenurin häufig bestimmt. Als Beispiele dienen die Arbeiten von Shearman (1958) und Klopper und Billewicz (1963).

Nach Oxidation, Aluminiumsäulen-Chromatographie, Acetylierung und Bildung von Schwefelsäurechromogenen wurde Pregnandiol farbspektrometrisch quantifiziert.

Die von den oben angeführten Autoren angegebenen Mittelwerte liegen für die einzelnen Schwangerschaftsmonate um das 1,5-2fache höher als unsere. Die Differenzen können auf die wesentlich größere Spezifität der von uns verwendeten cGLC zurückgeführt werden.

Tetrahydrocortison (=THE) und Tetrahydro-11-desoxycortisol (=THS)

Die Auswertungen ergaben, daß THE und THS im Verlauf der Schwangerschaft in geringem Maße vermehrt ausgeschieden wurden.

Die mittlere Eliminierung (jeweils $n=20$) stieg für THE von $603\mu\text{g}/24\text{Std.}$ im 3. Schwangerschaftsmonat (=SSM) bis auf $2003\mu\text{g}/24\text{Std.}$ im 10. SSM, für THS von $\leq 225\mu\text{g}/24\text{Std.}$ bis auf $1556\mu\text{g}/24\text{Std.}$ im gleichen Zeitraum.

Auch Cohen et alii (1973) beschreiben, daß Cortisol und seine Metaboliten im Verlauf der Schwangerschaft geringgradig vermehrt ausgeschieden werden.

Als Ursache können wachsende Plasmaspiegel für freies und gebundenes Cortisol während der Gravidität angeführt werden, zu denen die vermehrte mütterliche Transcortinproduktion sowie die Syntheseleistung der fetalen Nebennierenrinden beitragen sollen (nach Keller und nach Knapstein und Hoffmann).

Östrogene

Nachträglich wurden Östron, Östradiol-17 β und Östriol durch Zugabe der entsprechenden Referenzsteroide zum Steroidstandard in einigen Schwangerschaftschromatogrammen identifiziert.

Das Auftreten von diesen den Östrogenen entsprechenden Peaks zeigte, daß Reste von Östron, Östradiol-17 β und Östriol der Alkaliwäsche mit Natriumcarbonat entgangen waren.

Tab. 9: Ausscheidung von Östron, Östradiol-17 β und Östriol im Schwangerenurin ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$), erfaßt als Reste nach unvollständiger Alkaliwäsche.
Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/ β -Glucuronidase.
GW - Gestationswochen; n - Anzahl untersuchter Urine; $\bar{x}$ - Mittelwert

		Östron	Östradiol-17 β	Östriol
GW	n	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$
9-12	2	634	191	164
37-40	2	3653	765	18632

Im letzten Trimenon sezerniert die fetoplacentäre Einheit besonders große Mengen von Östriol, das sowohl im mütterlichen Plasma als auch im Urin die wichtigste Fraktion der Gesamtöstrogene darstellt (nach Knapstein und Hoffmann).

§ 13 Klinische Anwendung der ermittelten Normalwerte für Pregnantriol und Pregnantriolon bei Schwangeren mit behandeltem adrenogenitalen Syndrom

Zunehmend mehr Frauen mit homozygotem AGS erreichen durch Hydrocortison- oder Prednison-Dauertherapie Fertilität.

Normalwerte der Pregnantriol- und Pregnantriolonausscheidung während der Schwangerschaft können der Therapiekontrolle bei Frauen mit homozygotem AGS während einer Gravidität dienen.

Im Folgenden werden die Normbereiche und im Vergleich dazu die Pregnantriol- und Pregnantriolonausscheidung bei vier Schwangeren mit behandeltem AGS aufgeführt.

Eine adäquate Einstellung mit Hydrocortison oder Prednison während der Schwangerschaft kann bei den AGS-Patientinnen als gesichert gelten, wenn die von ihnen täglich im Harn ausgeschiedenen Pregnantriol- und Pregnantriolomengen die in Tab. 11, S. 65 aufgelisteten Normalwerte nicht wesentlich unter- oder überschreiten.

Tab. 11: Bereiche der physiologischen Pregnantriol- und Pregnantriolonausscheidung im Verlauf der Schwangerschaft im Harn ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$). Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/ β -Glucuronidase.
 n - Anzahl untersuchter Urine; GW - Gestationswochen; $\bar{x}$ - Mittelwert; $\bar{x} \pm 2\sigma$ - Normbereich; x_{Mi} - minimaler und x_{Ma} - maximaler bei 20 Schwangeren beobachteter Wert

a) Pregnantriol

GW	n	x_{Mi}	$\bar{x} \pm 2\sigma$	x_{Ma}
9-12	20	244	365 — 1477	2319
13-16	20	231	410 — 1056	1430
17-20	20	292	411 — 1771	2921
21-24	20	498	618 — 1724	2668
25-28	20	487	639 — 1853	2509
29-32	20	719	829 — 2825	4361
33-36	20	263	1130 — 3282	4424
37-40	20	843	1648 — 4028	6187

b) Pregnantriolon

GW	n	x_{Mi}	$\bar{x} \pm 2\sigma$	x_{Ma}
9-12	20	≤ 225	—	≤ 225
13-16	20	≤ 225	—	≤ 225
17-20	20	≤ 225	—	≤ 225
21-24	20	≤ 225	≤ 225 — 400	529
25-28	20	≤ 225	≤ 225 — 391	614
29-32	20	≤ 225	≤ 225 — 939	1766
33-36	20	≤ 225	245 — 1133	1951
37-40	20	≤ 225	401 — 1501	2306

Abb. 16: Pregnantriolausscheidung ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$) bei vier Schwangeren mit behandeltem AGS im Vergleich zu den bei gesunden Schwangeren ermittelten Normbereichen.

Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/ β -Glucuronidase.

Eingezeichnet sind:

a) $\bar{x}$ - Mittelwert; $\bar{x} \pm 2\sigma$ - Normbereich (grau schraffiert);
 x_{Mi} - minimaler und x_{Ma} - maximaler bei 20 gesunden Schwangeren beobachteter Wert

b) die Einzelwerte bei vier Schwangeren (Beispiele A-D) mit AGS unter folgender Therapie:

A (●) - 5 - 2,5 - 2,5 mg Prednison/die und
 0,05 - 0 - 0,05 mg Fludrocortison/die

B (◆) - 5 - 1,25 - 1,25 mg Prednison/die

C (★) - 2,5 - 0 - 2,5 mg Prednison/die

D (▲) - 1. - 26. Schwangerschaftswoche:

2,5 - 0 - 2,5 mg Prednison/die;

27. Schwangerschaftswoche bis Ende der Schwangerschaft: 0,75 - 0 - 0 mg Dexamethason/die.

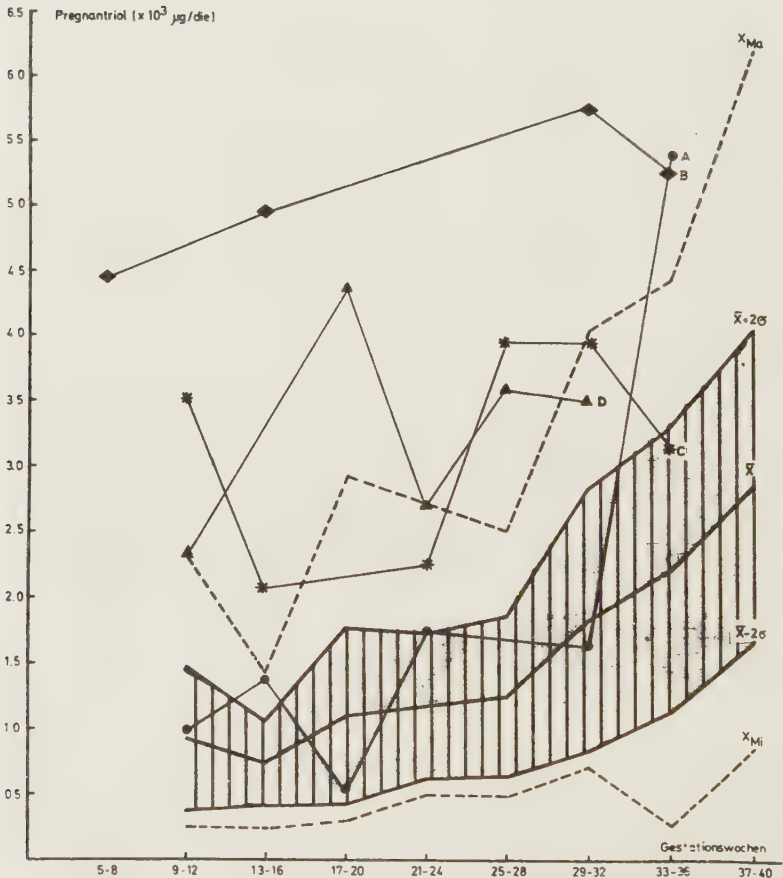


Abb. 17: Pregnantriononausscheidung ($\mu\text{g}/24\text{Std.}$) bei vier Schwangeren mit behandeltem AGS im Vergleich zu den bei gesunden Schwangeren ermittelten Normbereichen.

Enzymatische Hydrolyse durch Arylsulfatase/ β -Glucuronidase.

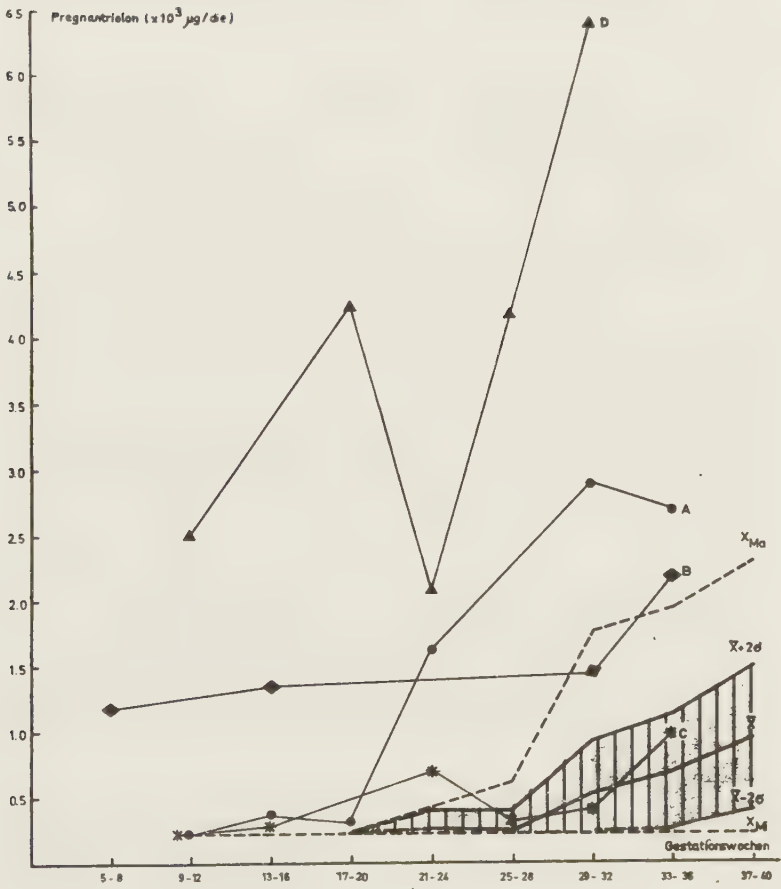
Eingezeichnet sind:

- a) $\bar{x}$ - Mittelwert; $\bar{x} \pm 2s$ - Normbereich (grau schraffiert);
 x_{Mi} - minimaler und x_{Ma} - maximaler bei 20 gesunden

- b) Schwangeren beobachteter Wert
 die Einzelwerte bei vier Schwangeren (Beispiele A-D) mit AGS unter folgender Therapie:

- A (●) - 5 - 2,5 - 2,5 mg Prednison/die und
 0,05 - 0 - 0,05 mg Fludrocortison/die
 B (◆) - 5 - 1,25 - 1,25 mg Prednison/die
 C (★) - 2,5 - 0 - 2,5 mg Prednison/die
 D (▲) - 1. - 26. Schwangerschaftswoche:

2,5 - 0 - 2,5 mg Prednison/die;
 27. Schwangerschaftswoche bis Ende der Schwangerschaft: 0,75 - 0 - 0 mg Lexamethason/die.



Beurteilung:

Bei Patientin A handelt es sich um die Schwangerschaft einer homozygot am AGS erkrankten Frau mit einem Mann, der heterozygoter Genträger für AGS ist. Unter der Therapie der Schwangeren mit 5 - 2,5 - 2,5 mg Prednison und 0,05 - 0 - 0,05 mg Fludrocortison/die verlief die Schwangerschaft komplikationslos. Das Kind wurde termingerecht geboren und ist als heterozygoter Genträger für das AGS klinisch gesund.

Die Pregnantriolausscheidung (s. Abb. 16, S. 66) der Patientin A lag während der Schwangerschaft meist im Normbereich. Lediglich im 4. Schwangerschaftsmonat (=SSM) wurde die obere Grenze des Normbereichs ($= \bar{x} + 2\sigma$) gering und im 9. SSM um das 1,7fache überschritten.

Die Pregnantriolonausscheidung (s. Abb. 17, S. 67) zeigte während der gesamten Schwangerschaft den Normbereich übertreffende Werte, die im 6. SSM das ca. 4fache, im 8. SSM das ca. 3fache und im 9. SSM das ca. 2,4fache der jeweiligen oberen Grenze des Normbereichs darstellten.

Legt man mehr Gewicht auf die Pregnantriol- als auf die Pregnantriolonausscheidung, kann bei Patientin A bis auf den 9. SSM auf eine adäquate Einstellung mit Prednison und Fludrocortison während der Schwangerschaft geschlossen werden.

Bei Patientin B handelt es sich um die Schwangerschaft einer Frau mit homozygotem AGS unter der Therapie von 5 - 1,25 - 1,25 mg Prednison/die. Der Ehemann ist kein Genträger für AGS. Das Kind wurde termingerecht und gesund geboren.

Patientin B schied im 4. SSM die 4fache, im 8. SSM die 2fache und im 9. SSM die 1,6fache Menge Pregnantriol aus, als es den oberen Grenzwerten der Normbereiche entsprechen würde (s. Abb. 16, S. 66).

Die Pregnantriolonausscheidung (s. Abb. 17, S. 67) zeigte während der gesamten Schwangerschaft Werte, die etwas höher lagen als die maximalen bei gesunden Schwangeren ausgeschiedenen Pregnantriolomengen.

Man hätte bei Patientin B also eine vorsichtige Erhöhung der täglichen Prednisonzufuhr während der gesamten Schwangerschaft vertreten können.

Die homozygot am AGS erkrankte Patientin C ist die Mutter eines termingerecht und gesund geborenen Kindes, dessen Vater nicht Genträger für das AGS ist. Therapiert wurde die Schwangere mit 2,5 - 0 - 2,5 mg Prednison/die.

Die zugehörigen Werte der Pregnantriolelimination (s. Abb. 16, S. 66) übertrafen die oberen Grenzwerte der Normbereiche um das 1,4 bis 2,4fache vom 3. bis 8. SSM; ihre Anordnung befindet sich

annähernd in der Region der bei 20 gesunden Schwangeren beobachteten maximalen Ausscheidungsmengen. Lediglich im 9. SSM lag die von Patientin C ausgeschiedene Pregnantriolmenge im Normbereich.

Die Pregnantriolonausscheidung (s. Abb. 17, S. 67) verhielt sich vor allem im 3. Schwangerschaftstrimenon den Normbereichen entsprechend.

Bei Patientin C kann man insgesamt von einer grenzwertig ausreichenden Prednisonzufuhr während ihrer Schwangerschaft sprechen.

Bei Patientin D handelt es sich um die Schwangerschaft einer an homozygotem AGS erkrankten Frau mit einem Mann, der heterozygoter Genträger für das AGS ist.

Die Therapie der Schwangeren erfolgte von Beginn der Gravidität bis zur 26. Schwangerschaftswoche mit 2,5 - 0 - 2,5 mg Prednison/die und von der 27. Woche bis Ende der Schwangerschaft mit 0,75 - 0 - 0 mg Dexamethason/die.

Ein am 1. Lebenstag im Plasma des Kindes gemessener und erhöhter 17-Hydroxy-Progesteronwert (6400 ng/dl) konnte bei wiederholter Bestimmung am 10. Lebenstag nicht bestätigt werden (538ng/dl).

Die Werte der Pregnantriolausscheidung (s. Abb. 16, S. 66) übertrafen die jeweilige obere Grenze des

Normbereichs im 3. SSM um das 1,6fache, im 5. SSM um das 4fache, im 6. SSM um das 1,6fache, im 7. SSM um das 1,9fache und im 8. SSM um das 1,2fache.

Pregnantriolon wurde im Vergleich zu den Normalwerten stark vermehrt ausgeschieden; die täglich ausgeschiedene Pregnantriolonmenge übertraf die obere Grenze des Normbereichs im 6. SSM um das 5,2fache, im 7. SSM um das 10,7fache und im 8. SSM um das 6,8fache (s. Abb. 17, S. 67).

Es ist darauf hinzuweisen, daß im 7. und 8. SSM die ausgeschiedenen Pregnantriolonmengen sogar wesentlich die eliminierten Pregnantriolmengen übertrafen.

Die anfängliche Substitutionstherapie mit 5 mg Prednison/die war sicher nicht ausreichend. Auch nach Erhöhung der Steroidzufuhr ab 27. Schwangerschaftswoche (Therapie ab 27. Woche bis Ende der Gravidität: 0,75 mg Dexamethason/die) lagen die ausgeschiedenen Pregnantriolmengen über den oberen Normgrenzen und Pregnantriolon wurde sogar stark vermehrt eliminiert.

In den letzten 2 Schwangerschaftsmonaten hätte man von daher einer weiteren vorsichtigen Erhöhung der zugeführten Steroidmenge zustimmen können.

§ 14 Diskussion

Pregnantriol konnte in allen Chromatogrammen sicher identifiziert werden. Die Retentionszeit des authentischen Pregnantriolpeaks im Standardchromatogramm stimmte mit der des Pregnantriolpeaks im Frobenchromatogramm überein.

Die getrennte Anwendung der Enzympräparate a) β -Glucuronidase und b) Arylsulfatase/ β -Glucuronidase erbrachte signifikant unterschiedliche Meßergebnisse.

Da a) lediglich zur Hydrolyse von Steroidglucuroniden und b) zur Hydrolyse von Steroidglucuroniden und -sulfaten führt, konnte festgestellt werden, daß ein Teil der Pregnantriol-Gesamtmenge im Schwangerenharn in glucuronidierter und ein anderer in sulfatierter Form vorlag.

Der glucuronidierte Anteil der Pregnantriol-Gesamtmenge im Schwangerenharn betrug zu Beginn der Schwangerschaft 63% und sank im 2./3. Trimenon bis auf Werte von 30%, der sulfatierte Anteil stieg im gleichen Zeitraum von 37% auf 70%.

Als Ursache kann man eine ansteigende Sulfatierungskapazität der fetoplacentaren Einheit für Steroide im Laufe der Schwangerschaft annehmen.

Eriksson und Gustafsson (1970) geben für Steroide

im Schwangerenurin einen Anteil von 64% für Glucuronide und von 36% für Sulfate an.

Laatikainen et alii (1980) berichten, daß die Placenta in den letzten Schwangerschaftsmonaten zunehmend mehr Steroidsulfate aus dem fetalen Kreislauf entzieht, die sich dann auch im mütterlichen Blut verteilen. Diese Aussage steht in Einklang mit unseren Beobachtungen, daß die Pregnantriolsulfatanteile im Verlauf der Schwangerschaft ansteigen.

Im Folgenden werden die unter §4 aufgeführten, früher ermittelten Pregnantriolumengen im Schwangerenurin mit denjenigen dieser Arbeit verglichen. Als Vergleichsgrundlage dienen unsere Ergebnisse nach Anwendung der Arylsulfatase/ β -Glucuronidase.

Bei Bildung von Pregnantriol-Schwefelsäurechromogenen erhalten

- 1) Fotherby und Love im Zeitraum 34.-39. Gestationswoche 7 Einzelwerte, die im Rahmen unserer Ergebnisse liegen und
- 2) Ronan et alii in einigen Einzelbestimmungen Ausbeuten, die das 3-4fache unserer Mittelwerte ausmachen. Diese Differenzen sind auf die wesentlich höhere Spezifität der von uns verwendeten cGLC zurückzuführen. Mithilfe der cGLC können sogar Steroide getrennt werden, die sich nur in der sterischen Konfiguration unterscheiden (Völlmin).

Bei Pregnantrioloxidation durch Wismutat erhalten

3) Fotherby et alii und

4) Harkness und Love

bei 9-33 Bestimmungen pro Schwangerschaftsmonat den unsrigen ähnliche Mittelwerte bis zur 28. Woche. Im 3. Trimenon liegen ihre Mittelwerte vergleichsweise niedriger als unsere und lassen sich ungefähr im Bereich der unteren Standardabweichungen unserer Ergebnisse einordnen.

Ebenfalls unter Verwendung der cGLC ermittelten

5) Begue et alii 15 Pregnantriol-einzelwerte. Diese liegen alle oberhalb unserer Mittelwerte, davon 9 etwas und 1 Einzelwert weit oberhalb der entsprechenden 90. Perzentilen unserer Auswertungen (siehe Abb. 8, S. 44).

Sollten diese geringen Abweichungen nicht rein zufälliger Natur sein, könnten sie damit erklärt werden, daß Begue et alii zusätzlich zur enzymatischen Hydrolyse mit β -Glucuronidase aus *Helix pomatia* die von uns nicht eingesetzte Solvolyse anwandten.

Im Folgenden wird das Verhalten der ausgeschiedenen Pregnantriolmengen im Verlauf der Schwangerschaft diskutiert.

1) Werden die von uns ermittelten Einzelwerte für den 2. Schwangerschaftsmonat ($2691\mu\text{g}/24\text{Std.}$

und 1055 μ g/24Std.) berücksichtigt, kann mit Vorbehalt ein stärkeres Absinken der ausgeschiedenen Pregnantriolmengen vom 2. bis 3. Schwangerschaftsmonat beschrieben werden, wie auch Ronan et alii es beobachteten.

Unsere Aussagen

- 2) keine signifikanten Änderungen der Pregnantriolausscheidung im Zeitraum 3.-7. Monat und
 - 3) signifikanter Anstieg im letzten Trimenon
- stimmen mit den Feststellungen von Ronan et alii, Fotherby et alii und Harkness und Love überein.

Alle Beobachtungen 1) - 3) korrelieren zudem mit den unter §3 aufgeführten Tendenzen der 17-Hydroxy-Progesteron-Plasmaspiegel im Verlauf der Schwangerschaft.

Homoki gibt bei Verwendung der cGLC und Derivatisierung der Steroide zu Methoxim-Trimethylsilyläthern folgende Normalwerte der täglichen Pregnantriolausscheidung bei nicht schwangeren Frauen an:

Tab. 10: Pregnantriolausscheidung bei nicht schwangeren Frauen (nach Homoki), (μ g/24Std.).
 $\bar{x}$ - Mittelwert; SD - Standardabweichung;
 n - Anzahl untersuchter Urine

Follikelphase		Lutealphase	
3.-11. Tag		17.-25. Tag	
n=8		n=7	
$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
339,5	113,7	701,1	256,7

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den von uns für die Schwangerschaft ermittelten, stellt man fest:

Nur die im Zeitraum 29.-40. Gestationswoche täglich ausgeschiedenen Pregnantriolmengen übertreffen mit großer Wahrscheinlichkeit diejenigen, die in einer Lutealphase eines weiblichen Zyklus eliminiert werden.

Pregnantriolon konnte bis zum 6. Schwangerschaftsmonat überhaupt nicht, ab 6. Schwangerschaftsmonat nur unter äußerstem Vorbehalt nachgewiesen werden (siehe auch §11, S. 50).

Die untere Nachweisgrenze von $225\mu\text{g}/24\text{Std.}$ wurde erstmals im 6. Monat überschritten.

Die tägliche Ausscheidung eines Steroids mit der Retentionszeit von Pregnantriolon stieg im 3. Trimenon signifikant an und erreichte im 10. Schwangerschaftsmonat Werte von $\bar{x} = 951\mu\text{g}/24\text{Std.}$ ($\text{SD} = 550\mu\text{g}/24\text{Std.}$), was ebenfalls den im 3. Trimenon erhöhten mütterlichen 17-Hydroxy-Progesteron-Plasmaspiegeln entsprechen würde.

Die klinische Anwendung der ermittelten Werte für die Pregnantriol- und Pregnantriononausscheidung wird unter §13, S. 64 diskutiert.

§ 15 Zusammenfassung

Bei 20 gesunden Schwangeren wurde im Zeitraum 3.-10. Schwangerschaftsmonat je einmal monatlich ein 24-Stunden-Urin gesammelt.

Unter Verwendung der Kapillar-Gasflüssigkeitschromatographie wurden die Urine auf ihren Gehalt an Pregnantriol und Pregnantriolon untersucht.

- 1) Pregnantriol war eindeutig über den untersuchten Zeitraum hinweg im Schwangerenurin nachweisbar. Zwischen 5. und 8. Monat sowie innerhalb des letzten Trimenons konnte ein signifikanter Anstieg der täglich ausgeschiedenen Pregnantriolmengen festgestellt werden.
- 2) Pregnantriol lag im Harn teils als Glucuronid und teils als Sulfat vor. Die Sulfate übertrafen mengenmäßig die Glucuronide ab Mitte des 2. Trimenons bis zum Ende der Schwangerschaft.
- 3) Bei weiblichen Feten wurde im 4.-6. Monat signifikant mehr Pregnantriol im mütterlichen Harn ausgeschieden als bei männlichen Feten.
- 4) Pregnantriolon konnte bis 6. Monat überhaupt nicht, im 7.-10. Monat nur unter Vorbehalt in geringen Mengen nachgewiesen werden.

- 5) Zur Therapiekontrolle von Patientinnen mit homozygotem AGS in der Schwangerschaft wurden Tabellen mit den ermittelten Bereichen für Normalwerte der Pregnantriol- und Pregnantriolonausscheidung im Harn während der Gravidität erstellt.

Retrospektiv wurde die Steroidsubstitutionstherapie bei vier Schwangeren mit AGS beurteilt.

Literaturverzeichnis

Appleby, J.I., Gibson, J., Norymberski, J.K.,
Stubbs, R.D.:

Indirect analysis of corticosteroids.

1. The determination of 17-hydroxycorticosteroids.

Biochem. J., London 60: 453 (1955).

, Norymberski, J.K.:

Indirect analysis of corticosteroids.

2. The determination and identification of urinary 17-hydroxy-20-oxo-steroids, unsubstituted at C-21.

Biochem. J., London 60: 460 (1955).

Begue, R.J., Morinière, M., Padieu, P.:

Urinary excretion of 5 β -pregnane-3 α ,6 α ,20 α -triol in human gestation.

J. Steroid Biochem. 9: 779-784 (1978).

Bongiovanni, A.M.:

Detection of pregnanediol and pregnanetriol in urine of patients with adrenal hyperplasia: suppression with cortisone (preliminary report).

Bull. Johns Hopkins Hosp. 92: 244 (1953).

Bongiovanni, A.M., Clayton, G.W., Jr.:

Simplified method for the routine determi-

nation of pregnanediol and pregnanetriol in urine.

Bull. Johns Hopkins Hosp. 94: 180 (1954).

Bongiovanni, A.M., Eberlein, W.R.:

Critical analysis of methods for measurements of pregnane-3 α ,17 α ,20 α -triol in human urine.

anal. Chem. 30: 388 (1958).

Bongiovanni, A.M., Eberlein, W.R.:

Defects in steroidal metabolism of subjects with adrenogenital syndrome.

Metabolism 10: 917 (1961).

Buster, J.E., Chang, R.J., Preston, D.L.,

Elashoff, R.M., Cousins, L.M., Abraham, G.E.,

Hobel, C.J., Marshall, J.R.:

Interrelationships of circulating maternal steroid concentrations in third trimester pregnancies. I. C₂₁ steroids: progesterone, 16 α -hydroxyprogesterone, 17 α -hydroxyprogesterone, 20 α -Dihydroprogesterone, Δ^5 -pregnenolone, Δ^5 -pregnenolone sulfate, and 17-hydroxy Δ^5 -pregnenolone.

J. Clin. Endocrin. and Metab. 48. No.1:

133-138 (1979).

Chambaz, E.M., Madani, C., Ros, A.:

TMS-enol-ethers: a new type of derivative for the gas phase study of dihydroxyacetone

side chain saturated corticosteroid metabolites.

J. Steroid Biochem. 3: 741 (1972).

Coats, P., Walker, E., Youssefnejadian, E.,
Craft, I.L.:

Variations in plasma steroid and prostaglandin concentrations during human pregnancy.

Acta Obstet. Gynec. Scand. 56:
453-457 (1977).

Cohen, M., Stiefel, M., Reddy, W.J., Laidlaw, J.C.:
The secretion and disposition of cortisol during pregnancy.

J. Clin. Endocrin. 36: 8 (1973).

Curtius, H.C., Völlmin, J., Zagalak, M.J.,
Zachmann, M.:

Gas chromatography of steroids and its clinical applications, including loading tests with deuterated compounds.

J. Steroid Biochem. 6: 677-684 (1975).

Diczfalussy, E.:

Endocrine functions of the human fetoplacental unit.

Fed. Proc. 23: 791 (1964).

Eriksson, H., Gustafsson, J.A.:

Excretion of steroid hormones in adults.

Steroids in urine from a pregnant woman.
Eur. J. Biochem. 16: 268-277 (1970).

Florensa, E., Harrison, R., Johnson, M.,
Youssefnejadian, E.:

Plasma 20 α -Dihydroprogesterone, progesterone
and 17-Hydroxyprogesterone in normal
human pregnancy.

Acta Endocrin. 86: 634-640 (1977).

Fotherby, K.:

The ovarian production of a pregnanetriol
precursor.

J. Endocrin. 25: 18-28 (1962).

Fotherby, K., James, F., Kamyab, S., Kloppe, A.I.,
Wilson, G.R.:

Excretion of 6-oxygenated metabolites of
progesterone and 5 β -pregnane-3 α ,17 α ,20 α -
triol during pregnancy.

J. Endocrin. 33: 133-143 (1965).

Fotherby, K., Love, D.N.:

A modified method for the estimation of
pregnanetriol in urine.

J. Endocrin. 20: 157-162 (1960).

Fotherby, K., Love, D.N.:

An investigation of the possible pre-
cursors of urinary pregnanetriol.

J. Endocrin. 21: 129-135 (1960).

German, A.I., Horning, E.C.:

Thermostable open tube capillary columns
for the high resolution gas chromatography of human urinary steroids.

J. of Chrom. Science 11: 76-82 (1973).

Gibson, G., Norymberski, J.K.:

A note on the rapid assay of 17-ketogenic
steroids in urine.

Ann. Rheumat. Dis., London 13: 59 (1954).

Gleispach, H.:

The use of different silylating agents for
structure analyses of steroids.

J. Chromatography 91: 407-412 (1974).

Grumbach, M.M., Kaplan, S.L., Villee, D.B.,

Villee, C.A., Zander, J., Solomon, S., Bird, C.E.,

Wilson, R., Wiqvist, N., Ryan, K.J., Diczfalusy, E.:

Endocrinology of the foeto-placental unit.

In: Proc. 2. Int. Congr. Endocr.

Excerpta Medica, Amsterdam: 691 (1965).

Harkness, R.A., Love, D.N.:

Studies on the estimation of urinary
pregnanetriol during pregnancy and childhood.

Acta Endocrin. 51: 526-534 (1966).

Harrison, R.F., Youssefnejadian, E., Brodovsky, H.,

Johnson, M., Dewhurst, Sir J.:

Secretion patterns of plasma-progesterone, 17-hydroxyprogesterone and 20 α -hydroxy-pregn-4-en-3-one in early normal pregnancy. Brit. J. Obstet. and Gynaec. 85: 921-926 (1978).

Holsboer, F., Knorr, D.:

Determination of urinary 17-hydroxypregnanolone by gas chromatography-mass spectrometry in patients with congenital adrenal hyperplasia. J. Steroid Biochem. 8: 1197-1199 (1977).

Homoki, J.:

Untersuchungen über die C19 und C21 Steroid-Ausscheidung im Kindesalter mittels Kapillarsäulenchromatographie. Habilitationsschrift Ulm (1978).

Keller, P.J.:

Die Schwangerschaft.
In: Labhart, A.: Klinik der inneren Sekretion.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3. Auflage: 612-627, 647-653 (1978).

Klopper, A., Billewicz, W.:

Urinary excretion of oestriol and pregnanediol during normal pregnancy. J. Obstet. and Gynaec. Brit. Cwlth. 70:

1024 (1963).

Klopper, A., Michie, E.A.:

The excretion of urinary pregnanediol
after the administration of progesterone.
J. Endocrin. 13: 360 (1956).

Knapstein, P., Hoffmann, G.:

Endokrinologie.

In: Friedberg, V., Rathgen, G.H. (Eds.):

Physiologie der Schwangerschaft. Ver-
änderungen des mütterlichen Organismus.

Thieme-Verlag, Stuttgart, New York,

1. Auflage: 209-246 (1980).

Knorr, D., Bidlingmaier, F., Kuhnle, U.:

Diagnosis and monitoring of therapy of the
various enzymatic defects causing congenital
adrenal hyperplasia by semiautomatic
capillary gas-liquid chromatography.

Horm. Res. 16: 201-208 (1982).

Laatikainen, T., Pelkonen, J., Apter, D.,
Ranta, T.:

Fetal and maternal serum levels of steroid
sulfates, unconjugated steroids, and
prolactin at term pregnancy and in early
spontaneous labor.

J. Clin. Endocrin. and Metab. 50, No. 3:
489 (1980).

Prader, A., Zachmann, M.:

Das adrenogenitale Syndrom.

In: Labhart, A.: Klinik der inneren Sekretion.

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York, 3. Auflage: 363-382, 417-419
(1978).

Ronan, F.F., Parsons, L., Namiot, R., Wotiz, H.H.:

Studies in steroid metabolism. IX. The
excretion of pregnane-3 α ,17 α ,20 α -triol
during pregnancy.

J. Clin. Endocrin. and Metab. 20:
355-363 (1960).

Sachs, L.:

Angewandte Statistik.

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York, 4. Auflage (1974).

Shackleton, C.H.L., Taylor, N.F., Honour, J.W.:

An atlas of gas chromatographic profiles
of neutral urinary steroids in health
and disease.

Packard-Becker B.V., Delft, Niederlande,
1. Auflage (1980).

Shearman, R.P.:

Some aspects of the urinary excretion of
pregnanediol in pregnancy.

J. Obstet. and Gynaec. Brit. Emp. 66:

1-11 (1959).

Soules, M.R., Hughes, C.I., Aksel, S., Tyrey, L.,
Hammond, C.B.:

The function of the corpus luteum of
pregnancy in ovulatory dysfunction and
luteal phase deficiency.

Fertil. and Steril. 36, No. 1:

31-36 (1981).

Tulchinsky, D., Simmer, H.H.:

Sources of plasma 17 α -hydroxyprogesterone
in human pregnancy.

J. Clin. Endocrin. and Metab. 35:

799-807 (1972).

Völlmin, J.A.:

Gas chromatographic separation of steroids
on glass capillary columns.

Chromatographia 3: 233-237 (1970).

Vogt, W., Jacob, K., Ohnesorge, A.B., Obwexer, H.W.:

Capillary gas chromatographic injection
system for large sample volumes.

J. Chromatogr. 194: 225 (1979).

Zander, J.:

Progesteron in menschlichem Blut und Ge-
weben. I. Progesteron im peripheren venö-
sen Blut der Frau.

Klin. Wschr. 33: 697 (1955).

Zander, J., Münstermann, A.M. von:

Progesteron in menschlichem Blut und Geweben. III. Progesteron in der Placenta, in der Uterusschleimhaut und im Fruchtwasser.

Klin. Wschr. 34: 944 (1956).

Zurbrügg, R.P.:

Congenital adrenal hyperplasia.

In: Gardner, L.I.: Endocrine and genetic diseases of childhood and adolescence.

W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 2nd edition: 476-500 (1975).

Danksagung

Zum Schluß meiner Arbeit möchte ich

Herrn Prof. Dr. D. K n o r r

sehr herzlich danken für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die jederzeit großzügige Unterstützung und seine Hilfsbereitschaft bei der technischen Durchführung meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Frau E. W o l f, die mich in die Laborarbeiten einführte und mir bei den Messungen stets hilfreich zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich bei Herrn Dr. H.-G. D ö r r für seine freundliche und unerläßliche Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. J. Z a n d e r, Frau Dr. B. B r ü g m a n n, Herrn Dr. A. E s s e r und Herrn Dr. P. M e h r i n g e r danke ich für die Vermittlung der 20 schwangeren Damen, die so zuverlässig an der Analysenserie teilnahmen.

Lebenslauf

Name	Anna Margarete H e i n e m a n n
Geburtsdatum	27. 06. 1958
Geburtsort	Bocholt i. Westfalen
Wohnort	Neuss a. Rhein
Konfession	röm.-katholisch
Eltern	Günther Heinemann - Textilkaufmann Margarete Heinemann, geb. Broichmann

1965 - 1968	St. Konrad - Grundschule Neuss
1968 - 1977	Mädchengymnasium Marienberg Neuss
Juni 1977	Reifeprüfung an der Schule Marienberg Neuss

Oktober 1977 - April 1978	Krankenpflegepraktikum im Rahmen eines freiwilligen sozialen Jahres in Lyon, Frankreich
April 1978	Beginn des Medizinstudiums an der A. M. Universität Köln
März 1980	Ärztliche Vorprüfung in Köln
Mai 1980	Wechsel zur LMU München
März 1981	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in München
März 1983	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in München

April 1983 -

März 1984

Praktisches Jahr an der LMU München

1) Innere Medizin,

Med. Klinik Innenstadt,

Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn

2) Chirurgie,

Chirurgische Klinik Großhadern,

Direktor: Prof. Dr. G. Heberer

3) Kinderheilkunde,

Dr. von Haunersches Kinderspital,

Direktor: Prof. Dr. H.-B. Hadorn

Frühjahr 1984

beabsichtigte Teilnahme am 3. Abschnitt
der Ärztlichen Prüfung in München

